



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

藥學博士 學位論文

**Nrf2 의존적 에너지 대사 조절을 통한 간손상과  
PPIX에 의한 간암 억제**

**Role of Nrf2-mediated energy metabolism in the  
inhibition of liver injury and PPIX-inhibition of cancer  
progression**

**2017년 2월**

서울대학교 대학원

약학과 약물학 전공

이 정 민

국문요약

Nrf2 의존적 에너지 대사 조절을 통한 간손상과 PPIX에  
의한 간암 억제

**Role of Nrf2-mediated energy metabolism in the inhibition of  
liver injury and PPIX-inhibition of cancer progression**

이 정 민

지도교수: 김 상 건

간세포암은 암 관련 사망원인 중 하나로 예후가 나쁘다. 중간엽성 간세포는 종양 미세환경에 적응하여 세포의 성장과 전이를 돕고, 마이크로RNA의 이상 조절에 영향을 미친다. 다양한 병리적 상황에서 소포체가 스트레스를 받게 되면 초기에는 소포체의 기능적 용량을 늘려 세포의 생존을 유지하지만 지속적인 스트레스는 세포 사멸을 일으킨다. 소포체 스트레스가 발생했을 때 세포의 생존과 사멸을 결정하는 스위치 분자에 대한 정보는 거의 없다. 세포의 에너지 대사 과정에 있어서 산소 소모와 활성산소의 증가는 세포의 기능 조절 및 활성산소 제거를 위한 기전에 영향을 준다. Nrf2 (Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2)는 항산화 및 해독

효소의 발현을 조절하며 산화적 스트레스와 발암 과정으로부터 세포를 보호하는 진핵세포의 핵심 전사인자이다.

본 연구에서는 Nrf2가 간세포암의 진행을 억제하며 세포 에너지 대사 조절을 통하여 세포 보호작용을 한다는 가설을 제기하였다. 위 가설을 검증하기 위하여 다음 세 가지 연구목표를 설정하였다. 첫째, Nrf2 활성화 작용이 있는 대표적 후보물질로서 프로토포르피린에 의한 만성 간질환 (간세포암) 제어 효능 및 관련된 기전을 연구하였고, 둘째, Nrf2가 Sirt3의 발현 증가를 통하여 미토콘드리아 에너지 대사를 조절하는 가능성을 규명하고자 했다. 마지막으로, Nrf2를 활성화하는 발굴한 타겟을 통하여 간손상에 수반되는 소포체 스트레스를 방어하는지 여부를 관찰하고자 하였다.

Nrf2 활성을 통한 간세포암의 억제 효과를 증명하기 위하여 활용된 연구방법은 Nrf2 활성 후보물질을 종양이식동물과 중간엽성 간암 세포주에 처리하여 그 효능 및 변화에 관련 기전을 탐구하였다. 항암연구 측면에서 볼 때 프로토포르피린은 miR-199a-5p를 증가시켜 HIF-1 $\alpha$ 와 E2F3를 억제하였으며 이를 통한 항암제 저항성에도 영향을 미쳤다. 또한, 간세포암 환자의 시료에서도 miR-199a-5p의 발현 저해 및 E2F3와의 관련성을 볼 수 있었으며, 간세포암의 증식과 침습 및 이동성을 억제하는 것으로 나타났다.

간세포 손상 방어 연구는, Nrf2 결손 쥐 모델과 Nrf2 과발현 세포 모델을 활용하였으며 유체역학을 통한 Sirt3 유전자 도입을 통하여 변화를 확인하였다. 연구결과에 따르면, 비알콜성 지방간 환자 시료뿐만 아니라 비만

쥐 모델에서도 소포체 스트레스 마커와 간 손상 지표가 양의 상관관계를 나타냈다. 소포체 스트레스 유도 물질에 의해 일어난 손상 간세포에서는 Nrf2가 억제되었으며, Nrf2 결손 쥐 모델에서는 소포체 스트레스가 증가하였다. Nrf2는 CPT1과 PGC-1 $\alpha$ 의 발현과 산소소모량을 증가시켜 미토콘드리아 기능을 조절하며, 전사인자로서 미토콘드리아 특이적 유전자인 Sirt3를 조절하는 것으로 해석된다. 비알콜성 지방간 환자 시료와, 고지방 식이를 먹인 쥐에서 Nrf2와 Sirt3가 공통적으로 감소했으며, 이는 소포체 스트레스를 증가시키는 역할을 함을 세포주 모델에서 확인하였다. 유체역학을 이용하여 Sirt3 유전자를 쥐에 주입 (Hydrodynamic gene delivery)한 결과에서도, Nrf2의 결손은 소포체 스트레스의 증가를 유발하였으며 Sirt3를 도입할 때 이러한 변화는 해소되었다.

본 연구에서는 1) 간세포암에서 Nrf2 활성 후보물질인 프로토포르피린은 miR-199a-5p를 증가시키며 에너지 대사 및 혈관신생에 관련된 유전자를 활성화 시키는 HIF-1 $\alpha$ 와 세포 주기에 기여하는 E2F3를 억제하여 간질환의 만성화에 의한 간세포암의 발전을 억제하는 효능을 보이며, 2) 소포체 스트레스에 의한 간세포 손상에서는 항산화 인자인 Nrf2가 감소하는데, 이는 미토콘드리아 특이적 Sirt3 조절을 통한 에너지 대사의 변화로 해석된다. 종합하면 Nrf2의 활성화제 중에는 종양 악성화를 억제하는 후보 물질이 있으며, Nrf2의 활성화는 미토콘드리아의 활성을 증진시키는 효과가 있는데 이는 Sirt3의 유도 발현을 경유하는 것으로 해석된다. 이러한 결과는 Nrf2

활성화 효과의 새로운 응용 가능성을 제시한다.

주요어: Nrf2, 간세포암, 프로토포르피린, 마이크로RNA, 소포체 스트레스,  
미토콘드리아, 간세포 손상

학번: 2011-31105

## 목 차

|                                                              |             |
|--------------------------------------------------------------|-------------|
| 국문요약.....                                                    | i           |
| 목차.....                                                      | v           |
| <b>List of figures.....</b>                                  | <b>vii</b>  |
| <b>List of abbreviations .....</b>                           | <b>viii</b> |
| <br>                                                         |             |
| <b>I. 서론.....</b>                                            | <b>1</b>    |
| <br>                                                         |             |
| <b>II. 연구재료 및 방법</b>                                         |             |
| II-1. 시약 및 재료 .....                                          | 9           |
| II-2. 세포 배양 .....                                            | 9           |
| II-3. 인체 조직 시료 .....                                         | 10          |
| II-4. 면역화학적 분석 (Immunoblotting) .....                        | 10          |
| II-5. 면역침강법 (Immunoprecipitation) .....                      | 11          |
| II-6. 형질도입 (Transfection) .....                              | 11          |
| II-7. 리포터 유전자 분석 (Reporter gene assay) .....                 | 11          |
| II-8. 생물정보학적 분석 .....                                        | 12          |
| II-9. 마이크로RNA의 Realtime RT-PCR .....                         | 12          |
| II-10. cDNA의 Realtime RT-PCR .....                           | 13          |
| II-11. 미토콘드리아DNA 측정.....                                     | 14          |
| II-12. siRNA knockdown 실험 .....                              | 15          |
| II-13. 크로마틴 면역침강법 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP)..... | 15          |
| II-14. 마이크로RNA 유사체 및 저해제 일과성 도입 .....                        | 16          |
| II-15. 체외 세포의 이동성/침습성 분석법 .....                              | 16          |
| II-16. 세포 독성 분석 (MTT assay) .....                            | 17          |
| II-17. 이중이식 .....                                            | 17          |
| II-18. 유체역학을 이용한 유전자 주입 (Hydrodynamic gene delivery) ...     | 18          |
| II-19. 혈액의 화학적 분석 .....                                      | 18          |
| II-20. 면역조직화학적 염색 .....                                      | 18          |

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| II-21. 통계분석 .....                                           | 19 |
| <b>III. 연구결과</b>                                            |    |
| <b>III-I. Nrf2 유도 물질에 의한 간세포암의 악성화 억제 효능</b>                |    |
| III-I-1. 프로토포르피린의 HIF-1 $\alpha$ 와 상피-중간엽성 이행 분자 마커 억제..... | 20 |
| III-I-2. 프로토포르피린에 의한 마이크로RNA 조절.....                        | 24 |
| III-I-3. miR-199a-5p 의 새로운 타겟 도출.....                       | 27 |
| III-I-4. 인간 간세포암 및 종양 이식 동물 모델에서의 E2F3 증가.....              | 30 |
| III-I-5. 프로토포르피린에 의한 암세포 증식 및 침습성/이동성 억제...                 | 33 |
| III-I-6. 종양 이식 동물실험.....                                    | 36 |
| <b>III-II. Nrf2 활성화에 의한 간세포 손상 억제</b>                       |    |
| III-II-1. Nrf2에 의한 미토콘드리아 특이적 Sirt3 유전자 발현 조절.....          | 39 |
| III-II-2. Nrf2에 의한 Sirt3의 전사조절.....                         | 42 |
| III-II-3. Nrf2에 의한 미토콘드리아 기능 조절.....                        | 45 |
| III-II-4. 인간 및 동물 지방간 모델에서의 Nrf2 및 Sirt3 감소.....            | 48 |
| III-II-5. 소포체 스트레스에 의한 간세포 손상에서의 항산화 인자 Nrf2의 역할.....       | 51 |
| III-II-6. Nrf2 결손과 소포체 스트레스 유도제에 의한 소포체 스트레스 증가.....        | 54 |
| III-II-7. 소포체 스트레스에서 Sirt3 유전자의 역할.....                     | 57 |
| III-II-8. Sirt3 유전자 전달에 의한 소포체 스트레스 및 간 손상 억제               | 60 |
| III-II-9. Nrf2 활성화 후보물질에 의한 Sirt3 증가.....                   | 63 |
| <b>IV. 고찰</b> .....                                         | 65 |
| <b>V. 참고문헌</b> .....                                        | 72 |
| <b>VI. 영문요약</b> .....                                       | 83 |



## List of figures

|                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figure 1.</b> Inhibition of EMT markers by PPIX in mesenchymal cancer cell lines.....                     | <b>21</b> |
| <b>Figure 2.</b> Induction of miR-199a-5p by PPIX.....                                                       | <b>25</b> |
| <b>Figure 3.</b> Inhibition of de novo synthesis of E2F3 by either miR-199a-5p or PPIX treatment.....        | <b>27</b> |
| <b>Figure 4.</b> Identification of E2F3 as a novel target of miR-199a-5p.....                                | <b>31</b> |
| <b>Figure 5.</b> The effects of PPIX on cell proliferation and migration/invasion.....                       | <b>34</b> |
| <b>Figure 6.</b> Inhibition of xenograft tumor growth by PPIX.....                                           | <b>37</b> |
| <b>Figure 7.</b> Nrf2 dependent Sirt expressions.....                                                        | <b>40</b> |
| <b>Figure 8.</b> Sirt3 induction by Nrf2 as a transcription factor.....                                      | <b>43</b> |
| <b>Figure 9.</b> Nrf2 regulates mitochondrial function.....                                                  | <b>46</b> |
| <b>Figure 10.</b> Increase of ER stress with NAFLD progression.....                                          | <b>49</b> |
| <b>Figure 11.</b> Nrf2 blocks tunicamycin-induced ER stress.....                                             | <b>52</b> |
| <b>Figure 12.</b> ER stress on Nrf2 deficient mice.....                                                      | <b>55</b> |
| <b>Figure 13.</b> Sirt3 blocks tunicamycin-induced ER stress.....                                            | <b>58</b> |
| <b>Figure 14.</b> Inhibition of ER stress by hydrodynamic gene delivery of Sirt3 on Nrf2-deficient mice..... | <b>61</b> |
| <b>Figure 15.</b> Induction of Sirt3 by a candidate of Nrf2 activator.....                                   | <b>64</b> |
| <b>Figure 16.</b> A schematic diagram illustrating the effect of Nrf2 activation in the liver                | <b>71</b> |

## **List of abbreviations**

ALT: Alanine transaminase

ARE: Antioxidant response element

AST: Aspartate transaminase

CHOP: C/EBP homologous protein

CPT1: Carnitine palmitoyl transferase-1

E2F3: E2F transcription factor 3

ER: Endoplasmic reticulum

Grp78: 78 kDa glucose-regulated protein

HFD: High-fat diet

HIF-1 $\alpha$ : Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit

HO-1: Heme oxygenase-1

KO: Knock-out

mRNA: Messenger RNA

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NAD<sup>+</sup>: Nicotinamide adenine dinucleotide

NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease

Nrf2: Nuclear erythroid 2-related factor 2

PGC-1 $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$

PPIX: Protoporphyrin IX; UTR, untranslated region

Silent information regulation-2 (*SIR2*)

Sirt: Sirtuin

UTR: Untranslated region

WT: Wild-type

XBP-1: X-box binding protein 1

ZEB: Zinc finger E-box-binding homeobox

## I. 서론

간세포암은 세계적으로 발생빈도가 높고 예후가 좋지 않은 악성 종양이다 (Burroughs, Hochhauser and Meyer 2004). 원발성 간암의 대부분은 간세포에서 유래하는 간세포암종이며, 만성 간질환이 지속되었을 때 나타난다. 간세포암은 초기에 특별한 증세가 없어 진행된 단계에서 진단되는 경우가 빈번하며, 수술 이후 재발 및 전이가 높아 사망률이 높다 (Tung-Ping Poon, Fan and Wong 2000). 기존에 사용되고 있는 세포증식억제 항암제에 저항성을 보이며, 경구용 멀티 키나제 억제제 소라페닙(Sorafenib, Nexavar<sup>®</sup>)을 진행성 간세포암의 치료제로 사용하고 있으나, 그 효과는 미비하다. 따라서 간세포암의 치료를 위하여 종양 미세환경 적응과 암의 성장 및 전이와 관련된 기전에 대한 폭 넓은 이해가 필요하다.

생체 내에는 산화적 스트레스를 제어하고 방어하기 위한 항산화 시스템이 보존되어 있다. 항산화 전사인자인 Nrf2 (Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2)는 항산화 효소의 발현을 조절하며 간, 폐, 뇌, 소화기관, 피부 등 인체 주요 조직에 분포하고 있다 (Itoh et al. 1999). 다양한 질환 모델에서 Nrf2의 활성화는 하위 유전자인 heme oxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 (NQO-1) 및 glutathione S-transferase (GST)를 증가시켜 산화적 스트레스 및 세포 손상을 억제하는 것으로 보고되었다 (Kobayashi et al. 2004, Kensler, Wakabayashi and Biswal 2007).

암에 있어 Nrf2는 양면성을 갖는다. 산화적 스트레스에 의한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 증가는 발암을 촉진시키는 반면에 (Halliwell 2007), Nrf2의 활성화는 항산화 유전자의 발현을 증가시켜 산화적 스트레스를 감소시킴에 따라 세포 보호 및 항암 효과를 갖는다 (Jeong, Jun and Kong 2006). Sulforaphane, curcumin, resveratrol, oltiplaz, synthetic oleanane triterpenoids와 같은 Nrf2의 활성 약물은 일시적인 Nrf2의 증가를 유도하고 이는 항암과 항산화 유전자를 활성화하여 종양 억제에 기여한다고 알려져 있다. 그러나 Nrf2의 gain-of-function 변이, Keap1의 loss-of-function 변이에 의한 Nrf2의 지속적인 활성화는 활성산소종의 축적을 통한 세포사멸을 억제하고 항암제 저항성을 유발할 뿐만 아니라 암세포의 성장과 증식에 기여한다고 보고되었다 (Kensler and Wakabayashi 2010, Sporn and Liby 2012). 또한, 이미 진행된 암세포에서 Nrf2의 활성화는 암세포 내 산화, 환원의 항상성을 유지를 통하여 암세포의 증식 및 항암제 저항성 획득의 기전으로 보고되었다 (Ikeda, Nishi and Sakai 2004).

E-cadherin에서 N-cadherin으로의 이행은 상피-중간엽성 이행(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 과정의 특징이며, 세포골격 재배치, 세포의 극성 손실, 기저막 분해시키는 특성을 갖는다 (Thiery et al. 2009). 상피-중간엽성 이행 과정을 통하여 종양세포는 이동, 침습 및 전이하여 악성화 된다 (Yang and Weinberg 2008). 또한, E-cadherin 발현 감소는 Nrf2의 활성을 증가시켜 항산화 시스템 활성화하며 이는 암세포의 항암제 저항성을 증가시킨다 (Kim

et al. 2012). 그러나 아직까지 Nrf2 활성화 약물에 의한 암세포 내의 신호 조절과 상피-중간엽성 이행에 미치는 영향 대한 연구는 부족한 실정이다.

최근 10년간 표적 mRNA에 결합하여 전사물을 분해하거나 번역을 억제하는 작은 크기의 단일 가닥 RNA로 존재하는 마이크로RNA의 역할이 대두되었다 (Bartel 2004). 대부분의 마이크로 RNA는 기관 및 세포 특이적으로 발현이 다르게 나타나며 그 기능적 측면에서 한 개의 마이크로 RNA는 다양한 표적 유전자를 조절하여 간 내에서는 간염, 알콜 및 비알콜성 지방간, 간 섬유화, 간암 등의 질병에 영향을 미친다 (Roberts, Lewis and Jopling 2011, Baltimore et al. 2008, McDaniel et al. 2014, Dolganiuc et al. 2009, Cermelli et al. 2011, Guo et al. 2009, Meng et al. 2007). 특히, 간암에 있어서 마이크로RNA는 종양 세포의 증식, 혈관신생, 이동, 침습, 항암제 저항성 획득을 조절하며 (Lu et al. 2005), 간세포암 환자의 생존률 저하 시키고 재발률을 높인다 (Lu et al. 2005, Giordano and Columbano 2013). 보고에 따르면 miR-34a, miR-195, miR-221은 세포 주기에 영향을 미치며 (Cheng et al. 2010, Xu et al. 2009, Gramantieri et al. 2009), miR-101, miR-122, miR-125는 세포사멸을 조절한다 (Su et al. 2009, Hsu et al. 2012, Zhao et al. 2012). 또한, miR-29b와 miR-125b는 혈관 신생 및 암화를 억제한다 (Fang et al. 2011, Alpini et al. 2011).

호기성 조건에서 포도당을 이용하여 미토콘드리아에서 TCA 회로(TriCarboxylic Acid Cycle)를 경유하여 에너지를 생성하는 정상세포와 달리 암세포는 해당과정을 통한 젖산 생성을 에너지 대사에 이용하는데 이를

와버그 효과(Warburg effect)라 한다 (Warburg 1956a, Warburg 1956b). 저산소 상태에서는 HIF-1 $\alpha$ 의 단백질 안정화가 촉진되어 그 양이 축적되며, HIF-1 $\alpha$ 의 활성화는 혈관신생, 해당작용 및 종양 세포 증식을 활성화 하여 vascular endothelial growth factor (VEGF), glucose transporter 1 (GLUT1), matrix metalloproteinase-2 (MMP2) 등의 표적 유전자를 유도하고 암의 진행을 촉진시킨다 (Lu, Forbes and Verma 2002, Ke and Costa 2006). HIF-1 $\alpha$ 는 miR-20a, miR-33a, miR-186, miR-199a-5p, miR-210등의 마이크로RNA의 조절을 받는다고 보고되었다 (Kang et al. 2012, Zhou et al. 2015, Liu et al. 2016).

프로토포르피린(protoporphyrin, PPIX)은 생체내에서 합성되며, 특정 파장의 빛을 흡수하여 활성화 되어 에너지를 발생시키고 이를 통하여 활성산소를 생성하여 세포독성을 유도하므로 광역동 치료에 이용된다 (Teng et al. 2011). Nrf2는 전사적으로 HO-1을 조절하여 항염과 항산화에 기여하며, heme의 생합성 과정에 있어서 Nrf2/HO-1은 rate-limiting 효소이다. 프로토포르피린 구조에 철을 포함하는 헤민(hemin)과 Nrf2의 활성화시키며, HO-1 증가 물질인 코발트 프로토포르피린(CoPP)도 헤민과 비슷한 기능을 한다 (Kim et al. 2001). 현재까지 프로토포르피린에 관한 연구는 광역동 치료법에 의한 세포 사멸에 국한되어 있으며 그 이전에 대한 연구는 없었다.

소포체는 단백질의 성숙에 관여하는 세포 내 소기관으로 단백질을 접합(folding), 조립(assembly), 당화(glycosylation) 및 이황화 결합(disulfide bond) 등의 과정을 통하여 활성 단백질 구조를 형성한다 (Braakman, Helenius and

Helenius 1992, Doms et al. 1993, Kleizen and Braakman 2004). 단백질 접힘에 대한 요구가 증가하거나 또는 미접힘 단백질이 소포체 내에 쌓이게 되면 소포체 기능 이상이 일어나게 되고 미접힘 단백질 반응(unfolded protein response, UPR)이 일어나는데 이를 소포체 스트레스라 한다 (Ozcan and Tabas 2012, Szegezdi et al. 2006b, Hampton 2000). 미접힘 단백질 반응 초기에는 미접힘 단백질을 분해하여 소포체 스트레스로부터 방어하지만 스트레스가 지속되면 세포 사멸 (Szegezdi et al. 2006a), 지질 축적 (Jo et al. 2013), 정상세포 활성화를 유도하여 간질환 (Koo et al. 2016), 당뇨병, 암 등 다양한 질병의 원인이 된다 (Ozcan 2012). 소포체 스트레스를 유발하는 물질로는 당화 과정을 억제하는 tunicamycin이외에도 소포체내 칼슘을 결핍시키는 thapsigargin과 이황화결합을 억제하는 DTT가 있다.

미토콘드리아는 세포 내 에너지를 생산하는 기관으로써 산화적 인산화 (Trounce et al. 1996), 지방의 베타 산화 (Kerner and Hoppel 2000), 아미노산 생산 (Roodyn, Reis and Work 1961) 등의 세포 내 에너지 대사에 관여한다. 정상 상태에서는 미토콘드리아가 세포 내 연료를 소비하여 에너지를 생산하지만, 병리 상황에서는 세포 사멸의 조절자로서 역할을 하며 활성 산소종 발생의 원인이 된다 (Kerner and Hoppel 2000). 미토콘드리아는 당뇨 (Orellana-Gavalda et al. 2011), 암 (Weinberg et al. 2010), 퇴행성 신경질환 (Farrar et al. 2013) 등의 여러 질병 모델의 치료적 타겟으로 보고되어 왔다. 많은 양의 에너지가 요구될 때 세포는 미토콘드리아의 생성과 에너지 생산 효율 증가를 촉진한다.



Silent information regulation-2 (*SIR2*) 는 *Saccharomyces cerevisiae*에서 처음으로 발견된 장수 관련 유전자로 NAD<sup>+</sup> 의존적 탈아세틸화 효소이다. 포유류에서의 sirtuin은 NAD<sup>+</sup> 의존적 탈아세틸화 효소일 뿐 아니라 ADP-ribosyltransferases이며 *Saccharomyces cerevisiae*의 *SIR2*에 상응한다 (Michan and Sinclair 2007). 또한 NAD<sup>+</sup> 의존적으로 영양과 산화 환원을 조절하며 lysine 잔기의 탈아세틸화를 통하여 세포 기능을 조절한다 (Purushotham et al. 2009, Li et al. 2014, Michan and Sinclair 2007). 인간은 Sirt1-7 까지의 유전자를 가지고 있으며 이는 세포내 에너지대사 조절에 기여한다. Sirt1,6,7은 핵 내에, Sirt2는 세포질, Sirt3,4,5는 미토콘드리아에 주로 분포하고 있다 (Michan and Sinclair 2007).

Sirt1과 Sirt3는 미토콘드리아 생합성을 증가시키고 미토콘드리아 기능을 개선시키는데 다양한 요인에 의하여 억제되면 대사 및 신경변성질환, 2형 당뇨병, 비만, 지방간, 알츠하이머, 암과 같은 질병을 유발하게 된다. Sirt3는 뇌, 심장, 신장, 갈색지방, 간에서 높게 발현되며 산화역량을 높인다 (Giblin, Skinner and Lombard 2014). 또한, Sirt3는 미토콘드리아 기능에 있어 중요한 역할을 한다. Sirt3의 증가는 세포 호흡 증가, 미토콘드리아 막 전위와 활성산소종의 감소에 기여하며 (Kong et al. 2010, Hallows, Lee and Denu 2006). Sirt3의 발현은 간에서는 단식 후에, 근육세포에서는 운동 및 단식, 영양 제한 후에 증가되며 지속적인 고지방 식이는 그 레벨을 낮춘다고 보고되었다 (Hirschey et al. 2010).

포유류에서 미토콘드리아 생합성은 peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ) and NRF-1에 의하여 조절된다. HO-1의 증가는 NRF-1의 전사를 Nrf2의존적으로 활성화 시켜 미토콘드리아 생합성에 기여하며, Acetyl-L-carnitine (ALCAR)는 Nrf2-NRF1 cascade의 활성을 ERK1/2의존적으로 활성화시켜 미토콘드리아의 칼슘 레벨을 조절하여 신경보호에 기여한다고 보고되었다 (Itoh et al. 2015). 그러나 미토콘드리아 특이적 유전자인 Sirt3와 Nrf2의 상관성 및 이를 통한 소포체 스트레스로부터의 간세포 보호는 아직 연구된 바가 없다.

본 연구를 통하여 Nrf2의 활성이 세포 에너지 대사를 조절하고 이를 통하여 간세포 손상을 방어하고 간세포암의 발달을 억제시키는 기전과 약물학적 응용을 조명하고자 다음과 같은 목표를 설정하였다.

첫째로, 간세포암에서 프로토포르피린에 의한 상피-중간엽성 이행 분자마커 억제 기전을 연구하고, 이에 관여하는 신규 마이크로RNA의 타겟 유전자를 도출하여 검증하였다.

둘째로 약물의 응용 가능성을 평가하기 위하여 종양이식 동물에서 이 유전자의 억제를 통한 암세포의 증식 및 침습 이동성 억제 효능을 규명하였다.

셋째로 소포체 스트레스에 의한 간세포 손상에서 Nrf2이 미치는 영향, 관련 신호를 연구하였으며, Nrf2에 의한 미토콘드리아 기능 조절 및 미토콘드리아 특이적 유전자인 Sirt3의 조절과 이에 따른 간 손상 및 소포체

스트레스 억제를 *in vivo* 및 *in vitro*에서 실험을 통해 밝히고자 하였다.

## II. 연구 재료 및 방법

### II-1. 시약 및 재료

Nrf2, PGC-1 $\alpha$ , CHOP, XBP-1, E2F3, Zeb1, Zeb2, vimentin, twist, G $\alpha$ 12를 인식할 수 있는 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. Sirt3, Snail, Slug 및 Acetyl-K 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA)에서 구매하였다. Grp78 항체는 Abcam (Cambridge, UK) 제품을 이용하였다. E-cadherin, HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$  항체는 BD Biosciences Pharmingen (San Jose, CA)에서 제공받았다. CPT1 항체는 Alpha diagnostic international (San Antonio, TX)에서 구입하였다. Hsa-miR-199a-5p hairpin inhibitor, scrambled control siRNA, siSirt3, siE2F3는 Dharmacon (Lafayette, CO)에서 공급받았다. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit과 goat anti-mouse IgGs는 Zymed Laboratories (San Francisco, CA)에서 제공받았다. 프로토포르피린은 Frontier Scientific, Inc (Logan, UT)에서 구매하였으며, [ $^3$ H]-palmitate는 Perkin-Elmer (Waltham, MA) 제품을 사용하였다. DeadEnd<sup>TM</sup> Colorimetric TUNEL System은 Promega (Madison, WI)에서 공급받았다.  $\beta$ -actin 항체, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), tunicamycin, dimethylsulfoxide, cisplatin, doxorubicin 시약들은 Sigma Chemical (St. Louis, MO)에서 구매하였다.

### II-2. 세포 배양

SK-Hep1, SNU449, SNU398, SNU878, PLC/PRF5, Hep3B 간암세포주들은 한국세포주 은행에서 구입하였다. AML12, HepG2, HEK293a 세포주는 American Type Culture Collection (Rockville, MD)에서 구입하였다. 세포주는 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 의 배양기에서 10% fetal bovine serum, 50 U/ml penicillin 및 50 µg/ml streptomycin 을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지에서 계대 배양하였다.

### II-3. 인체 조직 시료

간암 조직은 서울아산병원(Seoul, Korea)에서 2006년부터 2009년 사이에 외과적으로 암 제거 수술을 받고 시료를 기증한 187명의 환자 중에서 59명 환자들의 암 조직과 주변 정상 조직 시료를 사용하였다 종양은 World Health Organization의 병리 조직학적 분류기준에 근거하여 분류하였다.

22명의 정상 간 조직과 23명의 지방간 환자, 10명의 지방간염 환자의 간 조직 cDNA는 University of Kansas Liver Center Tissue Bank (Kansas City, KS)로부터 공여받았다. 모든 환자의 동의서를 받았고, 실험 프로토콜은 1975 헬싱키 선언의 윤리 가이드라인을 준수하였다.

### II-4. 면역화학적 분석 (Immunoblotting)

Sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide 젤 전기영동은 기 확립된 방법에 따라 수행하였다. 세포 추출액에서 얻은 단백질을 시료희석완충액 [63 mM Tris

(pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol 및 0.0013% bromophenolblue]에 희석하여 6~12%의 젤을 사용하여 전기영동하였다. 그 후, 190 mA로 1 시간 동안 nitrocellulose membrane에 단백질을 전이시켰다. 1차 항체로 반응시킨 후 2차 항체로 HRP-conjugated IgG를 한 시간 반응시키고 ECL chemiluminescence system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 발색하였다.

#### **II-5. 면역침강법 (Immunoprecipitation)**

PGC-1 $\alpha$ 와 Acetyl-K의 결합을 면역침강법을 통하여 관찰하였다. 총분획 단백질 500  $\mu$ g 과 해당 항체 1  $\mu$ g 을 4 °C에서 12-18시간 반응하였다. 항원×항체 결합체를 protein G-agarose 와 4 °C에서 2시간 동안 반응시킨 후 침전시켜 2×Laemmili 완충액과 반응시켰다. 추출된 단백질을 면역화학적 방법으로 관찰하였다.

#### **II-6. 형질도입 (Transfection)**

세포 배양 용기(6 well 배양접시)의 50-70% 정도 배양된 세포에 FuGENE<sup>®</sup>HD를 사용하여 과발현 플라스미드(1  $\mu$ g) 또는 과발현 플라스미드의 backbone 만을 가지는 플라스미드(Mock-transfection)를 세포 내로 도입하였다.

#### **II-7. 리포터 유전자 분석 (Reporter gene assay)**

유전자의 전사적 활성을 분석하기 위해 pGL3-Sirt3-ARE luciferase reporter를 형질도입 하였고 조정배지(conditioned media)로 Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit (GeneCopoeia, Rockville, MD) 프로토콜에 따라 실험을 수행하였다. 3'UTR 리포터 유전자 분석은 Luc-E2F3 3'-UTR (GeneCopoeia, Rockville, MD)을 이용하여 리포터 유전자와 마이크로RNA 유사체(또는 저해제)를 같이 형질도입하였다. Firefly luciferase와 Renilla luciferase 활성을 Dual Luciferase Assay Kit (GeneCopoeia, Rockville, MD)를 사용하여 측정하였다. Firefly luciferase 활성은 Renilla luciferase 값으로 보정하였다.

## II-8. 생물정보학적 분석

GEO 데이터베이스(GSE25097)를 활용하여 유의적으로 변화하는(2배 이상 또는 0.5배 이하,  $P < 0.01$ ) 유전자군을 도출하였고, DAVID 6.7 소프트웨어의 gene ontology 분석을 통해 그룹화 한 후 암과 연관된 마이크로RNA의 타겟 유전자를 대상으로 STRING v9.1 데이터베이스를 사용하여 네트워크를 도출하였으며, Cytoscape 소프트웨어를 이용하여 도식화하였다.

## II-9. 마이크로RNA의 qRT-PCR

miScript Reverse Transcription kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 세포에서 추출한 총 RNA (1  $\mu$ g)에서 cDNA를 얻었다. Precursor 마이크로RNA와 mature 마이크로RNA 발현양은 miScript SYBR Green PCR kit

(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용해 프로토콜에 따라 측정하였고, 결과값은 U6의 상대적인 값으로 보정하였다. 증폭된 산물의 특이성은 melting curve 분석을 통하여 확인하였다. DNA 증폭에 사용된 primer는 다음과 같다.

| Gene symbol  | Forward                   | Reverse                  |
|--------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>miRNA</b> |                           |                          |
| miR-199a-5p  | CCCAGTGTTTCAGACTACCTGTTC  | Universal reverse primer |
| miR-519d     | CCUCCAAAGGGAAGCGCUUUCUGUU |                          |
| miR-20b      | CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG   |                          |
| miR-18a      | TAAGGTGCATCTAGTGCAGATAG   |                          |
| miR-18b      | UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAG   |                          |
| miR-20a      | TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG   |                          |
| miR-93       | CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG   |                          |
| miR-106a     | AAAAGUGCUGUACAGUGCAGGUAG  |                          |
| miR-106b     | UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU     |                          |
| <i>RNU6B</i> | AATTCGTGAAGCGTTCCATATT    |                          |

## II-10. cDNA의 qRT-PCR

총 RNA의 분리는 제조사의 방법에 따라 Trizol 또는 Qiagen (Valencia, CA)의 RNeasy mini kit를 사용하여 추출하였다. 총 RNA (1 µg)와 d(T)<sub>16</sub> primer 및 AMV 역전사효소(reverse transcriptase)를 반응시켜 cDNA를 얻었다. 얻어진 cDNA를 사용하여 유전자들의 상대적인 양을 SYBR green dye를 사용하여 realtime RT-PCR법에 의해 정량하였다. 유전자의 CP 값을 β-actin으로



보정하였다. 또한 melting curve 분석을 통하여 증폭된 PCR 산물의 특이성을 확인하였다. 실험에 사용한 primer 서열은 다음과 같다.

| Gene symbol       | Forward                  | Reverse                      |
|-------------------|--------------------------|------------------------------|
| <b>Human mRNA</b> |                          |                              |
| <i>β-actin</i>    | ACCCACACTGTGCCCATCTAC    | TCGGTGAGGATCTTCATGAGGTA      |
| <i>E2F3</i>       | CGAGCTCGTTATGCTTCGTGTGA  | CCCTCGAGGGACTTAGCCAGGAGATGAA |
| <i>CHOP</i>       | CTGGAAGCCTGGTATGAGGAT    | CAGGGTCAAGAGTAGTGAACGT       |
| <i>GRP78</i>      | CATCACGCCGTCCTATGTCG     | CGTCAAAGACCGTGTTCTCG         |
| <i>PGC1α</i>      | TCAGTCCTCACTGGTGGACA     | TGCTTCGTCAAAAACA             |
| <i>CPT-1</i>      | ACAGTCGGTGAGGCCTCTTATGAA | TCTTGCTGCCTGAATGTGAGTTGG     |
| <b>Mouse mRNA</b> |                          |                              |
| <i>β-actin</i>    | CTGAGAGGGAAATCGTGCGT     | TGTTGGCATAGAGGTCTTTACGG      |
| <i>chop</i>       | CATACACCACCACACCTGAAAG   | CCGTTTCCTAGTTCTTCCTTGC       |
| <i>grp78</i>      | TGGTATTCTCCGAGTGACAGC    | AGTCTTCAATGTCCGCATCC         |
| <i>xbp1s</i>      | GGTCTGCTGAGTCCGCAGCAGG   | AGGCTTGGTGTATACATGG          |
| <i>pgc1α</i>      | ACGAGGCCAGTCCTTCCTCC     | AGCTCTGAGCAGGGACGTCT         |
| <i>cpt1</i>       | GTCGCTTCTTCAAGGTCTGG     | AAGAAAGCAGCACGTTTCGAT        |
| <i>inos</i>       | ATGTCCGAAGCAAACATCAC     | TAATGTCCAGGAAGTAGGTG         |
| <i>sirt1</i>      | CCTTGAGACTGCGATGTTA      | GTGTTGGTGGCAACTCTGAT         |
| <i>sirt2</i>      | GCAGTGTCAGAGCGTGGTAA     | CTAGTGGTGCCTTGCTGATG         |
| <i>sirt3</i>      | CTGACTTCGCTTTGGCAGAT     | GTCCACCAGCCTTTCCACAC         |
| <i>sirt4</i>      | CGCTGCTCAAGATCCCTAAG     | GCGACACAGCTACTCCATCA         |
| <i>sirt5</i>      | AGCCAGAGACTCAAGACGCCA    | AGGGCGAGCTCTCTGTCCACC        |

|              |                      |                      |
|--------------|----------------------|----------------------|
| <i>sirt6</i> | TCGGGCCTGTAGAGGGGAGC | CGGCGCTTAGTGGCAAGGGG |
| <i>sirt7</i> | GGCACTTGTTGTCTACACG  | AGGTCGGCAGCACTCACAGG |

## II-11. 미토콘드리아DNA 측정

제조사의 프로토콜에 따라 (Nucleogen, Korea) DNA를 추출한 후 미토콘드리아DNA (mtDNA) SYBR green qRT-PCR assays를 통하여 측정한다. cytochrome c oxidase subunit II (mtCOX II) 레벨을 qRT-PCR에 의해 정량하고, nuclear-encoded receptor-interacting protein 140 (RIP140) 값으로 보정하였다. 실험에 사용한 primer 서열은 다음과 같다.

| Gene symbol    | Forward                | Reverse                |
|----------------|------------------------|------------------------|
| <i>mtcoxII</i> | TCTCCCCTCTCTACGCATTCTA | ACGGATTGGAAGTTCTATTGGC |
| <i>rip140</i>  | TCCCCGACACGAAAAAGAAAG  | ACATCCATTCAAAAGCCCAGG  |

## II-12. siRNA knockdown 실험

선택적 siRNA는 Dharmacon (Lafayette, CO)에서 구입하였다. 특정 단백질 발현저해를 위하여 FuGENE®HD reagent 제조사의 권장방법에 따라 세포에 siRNA (20 nmol)를 처리하였다. 효과적인 발현저해를 위하여 세포를 1% 혈청이 포함된 배지에서 72-96 시간동안 유지하였다. 발현저해 효과는 면역화학적 분석법을 통해 확인하였다.

### II-13. 크로마틴 면역침강법 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP).

Nrf2 플라스미드를 24시간 트랜스펙션 후 최종 농도가 1% 이 되도록 하여 formaldehyde로 10 분간 고정시킨 후, ChIP assay kit protocol (Upstate Biotechnology, NY)에 따라 실험을 진행하였다. Human Sirt3 프로모터 내의 antioxidant response element (ARE) 의 결합부위를 위한 특이적 primer로

sense: 5'-TGATAAGGCACTTCCAGGTTG-3';

antisense: 5'-GCTGCCCCCTTATCAGATGACT-3', 212 bp를,

negative control primer로

sense, 5'-GACAGGATCTTGCTCTGTTGC-3';

antisense, 5'-GGGATCATTTGAGGTCAGGAG-3', 224 bp를 사용하였다.

### II-14. 마이크로RNA 유사체 및 저해제 일과성 도입

마이크로RNA 유사체로 사용한 이중 마이크로RNA는 기존에 보고된 방법에 따라 합성하였다. 대조 유사체는 Dharmacon (Lafayette, CO)에서 구매하였다. 합성한 이중 마이크로RNA 염기서열은 다음과 같다.

199a-5p mimic: 5'-CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC-3' (guide),

5'-ACAGGUAGUCUGAACACUGGGUA-3' (passenger).

마이크로RNA 저해제는 miR-199a-5p hairpin inhibitor (Dharmacon, Lafayette, CO)을 구매하여 활용하였으며, 20 nM의 마이크로RNA 유사체 또는 100 nM의 마이크로RNA 저해제를 세포에 도입하였다.

## II-15. 체외 세포의 이동성/침습성 분석법

24-well 트랜스웰(24-well Transwell®)의 필터 아래 부분을 제 1형 콜라겐 (Type I collagen, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)으로 코팅하였다. 체외 세포의 침습성 분석을 수행할 때는 상층부에 매트릭셀(Matrigel, Collaborative Research, Lexington, KY)을 추가적으로 코팅하였다. 이 후 실험과정은 이동성/침습성 실험이 동일하다. 트랜스웰을 24-well 배양접시에 넣고,  $5 \times 10^4$  개/ml의 세포 100  $\mu$ l를 트랜스웰 안에 넣었다. 37°C 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 트랜스웰에 남아있는 배지를 제거하고, 메탄올로 세포를 고정한 후, 헤마톡실린에 10분, 이오신에 4분간 염색한 후, 트랜스웰 상층부에 이동하지 못한 세포들은 면봉으로 제거하였다. 현미경(200배율)으로 관찰하며 침습/이동한 세포의 개수를 측정하였다.

## II-16. 세포 독성 분석 (MTT assay)

세포독성을 측정하기 위하여, 세포를 48-well dish ( $1 \times 10^5$  세포/well)에 깔았다. 약물을 처리한 뒤, MTT 시약(0.25 mg/ml)을 4시간 동안 반응시켜 살아있는 세포를 염색하였다. Formazan 크리스탈을 dimethyl sulfoxide로 용해시켜, ELISA microplate reader (Tecan, Research Triangle Park, NC) 기계를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 약을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 계산하였다. [세포 생존율(% 대조군) = 100

× (약물 처치 군의 흡광도)/(대조군의 흡광도)].

## II-17. 이종이식

동물실험은 실험동물 윤리가이드라인 지침에 의거하여 수행하였다. SK-Hep1 세포( $1 \times 10^7$  세포)를 nude 마우스의 왼쪽 옆구리에 경피 주입하였다 (군당 10마리). 1주일에 3회 caliper를 이용하여 종양크기를 측정하였다. 종양부피는 다음의 공식을 통하여 산출하였다: 종양부피 ( $\text{cm}^3$ ) =  $0.52 \times (\text{폭})^2 \times (\text{길이})$ . 세포를 이식한 후 10주 뒤에 이산화탄소 가스를 이용하여 마우스를 안락사시켰다. 종양을 적출하여 무게를 측정하고 종양 조직을 갈아 실험하였다.

## II-18. 유체역학을 이용한 유전자 주입 (Hydrodynamic gene delivery)

정상 쥐와 Nrf2 결손 쥐에 pcDNA 또는 pcDNA-Sirt3 플라스미드 25  $\mu\text{g}$ 을 3 ml의 주사용수에 희석하여 꼬리정맥에 주입하였다. 4일뒤에 tunicamycin (2 mg/kg body weight, i.p.)을 투여한 후 3일뒤에 sacrifice 하였다.

## II-19. 혈액의 화학적 분석

혈장의 Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL)은 자동 혈액 분석기인 Spectrum<sup>®</sup> (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) 를 사용하여 분석하였다.

## II-20. 면역조직화학적 염색

조직을 10% 포르말린으로 고정하고, 파라핀에 매몰시켜 4  $\mu\text{m}$  두께로 절단하여 슬라이드에 표본을 고정시킨 후 E2F3 (EMD Millipore, Billerica, MA), Ki-67 (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA), CD31 (Thermo Scientific, Fremont, CA) 항체를 반응시켰다.

## II-21. 통계분석

면역화학적 분석은, Scanning densitometry는 Image Scan & Analysis System (Alpha-Innotech Corporation, San Leandro, CA)을 사용하여 배경을 제외시킨 밴드 영역의 강도를 Adobe Photoshop CS5 software로 정량하였다. One way analysis of variance, unpaired 또는 paired Student's t-test로 그룹간 유의성을 평가하였다. 데이터는 산술평균  $\pm$  S.E.로 표기하였으며 통계적 유의성은  $P < 0.05$  또는  $P < 0.01$ 을 기준으로 하였다. SPSS 프로그램을 이용하여 Spearman의 상관분석방법에 따라 상관계수 ( $r$ )을 구하였다.

### III. 연구 결과

#### I. Nrf2 유도 물질에 의한 간세포암의 악성화 억제 효능

##### 1. 프로토포르피린의 HIF-1 $\alpha$ 와 상피-중간엽성 이행 분자 마커 억제

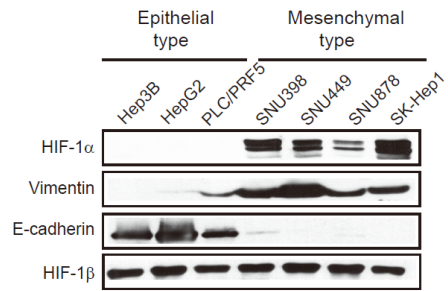
HIF-1 $\alpha$ 와 상피-중간엽성 이행 분자마커와의 관계를 알아보고자 상피성 간암 세포주 3종(Hep3B, HepG2, PLC/PRF5)과 중간엽성 간암 세포주 4종(SNU398, SNU449, SNU878, SK-Hep1)을 비교한 결과 중간엽성 간암 세포주에서 HIF-1 $\alpha$ 의 양이 증가했다 (Fig. 1A). 이는 중간엽성 세포의 특징인 vimentin의 증가와 E-cadherin의 감소와도 일치했다. 프로토포르피린(3 $\mu$ M)을 처리하였을 때 중간엽성 간암 세포주에서 Nrf2의 단백질 양 증가가 나타났다. Nrf2의 활성 후보물질인 프로토포르피린이 HIF-1 $\alpha$ 를 억제 하였기 때문에 Nrf2에 의한 HIF-1  $\alpha$ 의 억제 가능성을 시사한다 (Fig. 1B). 또한 Zeb1/2, snail, slug, twist등의 상피-중간엽성 이행 분자 마커의 억제를 농도, 시간 의존적으로 보였기 때문에 저산소 상태는 상피-중간엽성 이행을 도우며 HIF-1 $\alpha$  증가를 의미한다 (Fig. 1C, D).

중간엽성 간암에서 프로토포르피린의 항암제 감수성을 알아보기 위하여, 중간엽성 간암 세포주의 하나인 SK-Hep1에 프로토포르피린 단독 또는 기존에 알려진 항암화학요법과의 병용 처치를 통하여 세포독성을 관찰하였다. 프로토포르피린의 단독 처치시 SK-Hep1에서 낮은 세포독성을 유발하였으나, 항암화학요법제와 병용으로 처치시 세포독성의 증가폭이 크게 나타났기

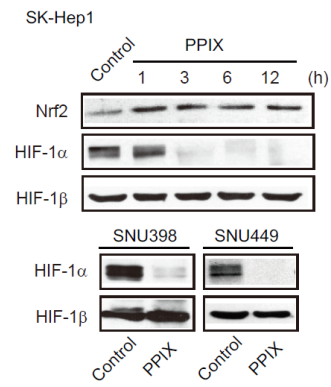
때문에 (Fig. 1E) 프로토포르피린은 항암제 감수성 증가 및 세포독성 증가로  
중간엽성 간암 억제에 효과적이다.



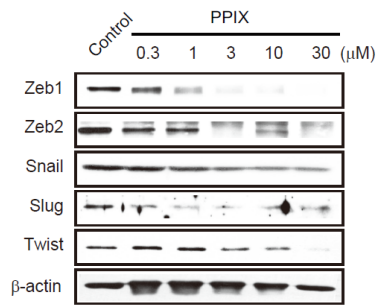
A



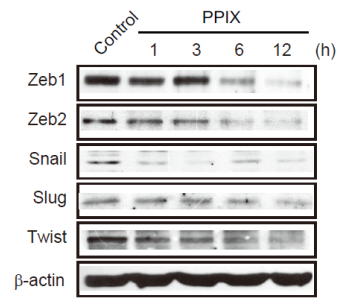
B



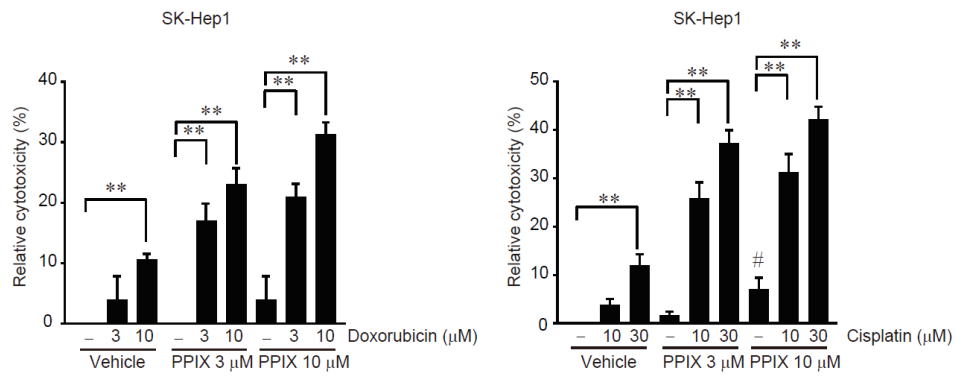
C



D



E



**Figure 1. Inhibition of EMT markers by PPIX in mesenchymal cancer cell lines**

(A) Expression of HIF-1 $\alpha$  and EMT markers in liver tumor cell lines.

(B) Induction of Nrf2 and inhibition of HIF-1 $\alpha$  by PPIX treatments. SK-Hep1 cells were incubated in a medium containing 3  $\mu$ M PPIX for 1–12 h, whereas SNU398 and SNU449 cells were treated with PPIX for 3 h. Equal loading of proteins was verified by immunoblottings for HIF-1 $\beta$ .

(C) The concentration-response of PPIX in SK-Hep1 cells. The cells were incubated with the indicated concentrations of PPIX for 3 h.

(D) The time-course effects of PPIX. SK-Hep1 cells were treated with 3  $\mu$ M PPIX for 1–12 h. Equal loading of proteins was confirmed by immunoblottings for  $\beta$ -actin.

(E) Chemosensitization of mesenchymal liver tumor cells by PPIX. SK-Hep1 cells were exposed to PPIX (3 or 10  $\mu$ M) with or without doxorubicin (left) or cisplatin (right) of the indicated concentrations for 48 h. The data represents the mean  $\pm$  S.E. from four independent experiments (treatment mean significantly different from vehicle- or PPIX-treated group, \*\*P < 0.01, or vehicle group, #P < 0.05).

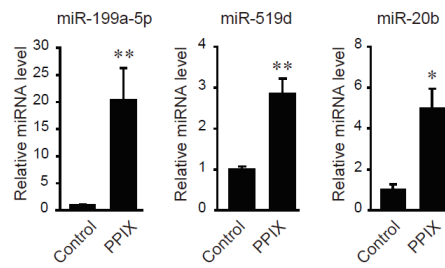
## 2. 프로토포르피린에 의한 마이크로RNA 조절

마이크로RNA의 이상 조절은 간암 환자의 예후에 영향을 미치며 HIF-1 $\alpha$ 의 전사후 조절에 영향을 미치기 때문에 (Bartel 2004, Lu et al. 2005), HIF-1 $\alpha$  mRNA의 3'-untranslated region (3'-UTR) 부위에 결합할 수 있는 마이크로RNA를 생물정보학적 분석 프로그램인 TargetScan6.1 데이터베이스와 miRANDA에 의하여 도출하였다 (Fig. 2A, C). 다음으로, 도출된 마이크로RNA가 프로토포르피린에 어떠한 영향을 받는지 관찰하였다. 그 중에서 miR-199a-5p는 프로토포르피린 처리 후 중간엽성 간암 세포주에서 현저하게 증가하였으며, miR-20b와 miR-519d의 증가도 나타났다. miR-199a-5p는 miR-20b와 miR-519와 비교했을 때 증가폭이 컸으며 그 양이 중간엽성 간암에서 많기 때문에, miR-199a-5p를 HIF-1 $\alpha$ 의 직접 타겟으로 주목하였다 (Fig. 2B). miR-199a-5p는 다른 중간엽성 간암 세포인 SNU878과 SNU449에서도 프로토포르피린 처리에 의하여 증가하였다 (Fig. 2D). 그러므로 중간엽성 간세포암에 Nrf2 활성 후보물질인 프로토포르피린 처리는 miR-199a-5p를 증가시키며 이를 통하여 HIF-1 $\alpha$ 를 억제할 수 있음을 시사한다.

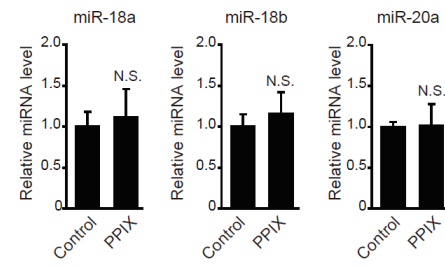
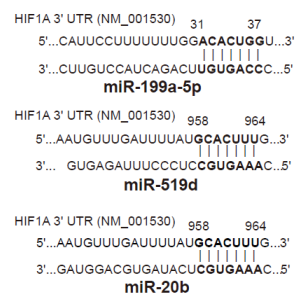
A

| miRNA candidates targeting HIF1A | Chromosome | Gene cluster |
|----------------------------------|------------|--------------|
| miR-199a-5p                      | 19q13.2    | miR199a-214  |
| miR-519d                         | 19q13.41   | C19MC        |
| miR-20b                          | Xq26.2     | miR106a-363  |
| miR-18a                          | 13q31.3    | miR17-92     |
| miR-18b                          | Xq26.2     | miR106a-363  |
| miR-20a                          | 13q31.3    | miR17-92     |
| miR-93                           | 7q22.1     | miR106b-25   |
| miR-106a                         | Xq26.2     | miR106a-363  |
| miR-106b                         | 7q22.1     | miR106b-25   |
| miR-138                          | 3p21.32    |              |

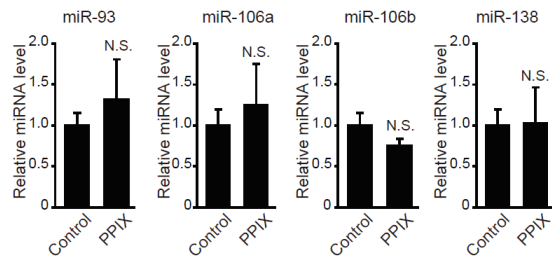
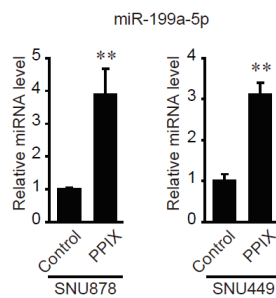
B



C



D



**Figure 2. Induction of miR-199a-5p by PPIX**

(A) A list of miRNA candidates targeting HIF1A. The miRNAs were extracted using TargetScan 6.1 and miRanda.

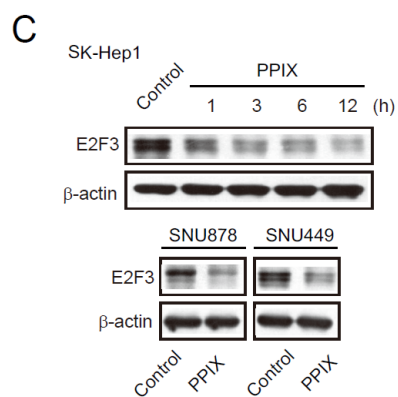
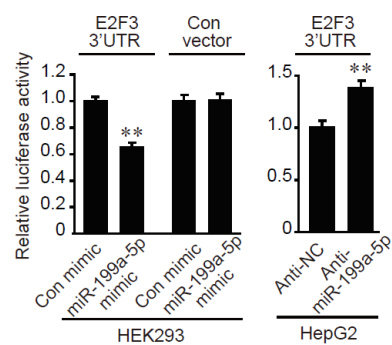
(B) The effect of PPIX on miRNA expression targeting HIF1A. The levels of miRNAs were determined by qRT-PCR assays in SK-Hep1 cells treated with 3  $\mu$ M PPIX.

(C) Sequence motifs of the 3'-UTR of HIF1A and its match seed sequences of candidate miRNAs.

(D) The levels of miR-199a-5p after PPIX treatment in mesenchymal HCC cells. qRT-PCR assays for miR-199a-5p transcripts in SNU878 or SNU449 cells. For B and D, the data represent the mean  $\pm$  S.E. from 3 or 4 different independent experiments (significantly different from vehicle-treated control, \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; N.S., not significant).

### 3. miR-199a-5p 의 새로운 타겟 도출

miR-199a-5p의 증가는 발암 유전자를 억제할 수 있기 때문에, 프로토포르피린에 의해 증가하였던 miR-199a-5p, miR-20b, miR-519d 의 후보 타겟 유전자들의 네트워크를 분석하고 DAVID 소프트웨어를 통한 KEGG pathway를 분류하였다. 그 결과 TGF- $\beta$  수용체 신호, Wnt 수용체 신호, 세포 증식, 혈관신생과 관련된 유전자들을 도출할 수 있었다. 마이크로RNA는 여러개의 타겟 유전자 억제에 복합적으로 영향을 주기 때문에, 기존에 보고한 HIF-1 $\alpha$  이외에도 세포 증식에 관여하는 E2F3를 miR-199a-5p의 새로운 타겟으로 제시하였다 (Fig. 3A). E2F3 mRNA에는 3'-UTR부위에 miR-199a-5p가 결합할 것으로 추정되는 부위가 있다. miR-199a-5p가 E2F3를 억제하는지 확인하기 위하여, 마이크로RNA를 *in vitro*에서 억제하거나 도입하여 그 기능을 분석하였다. E2F3 3'-UTR 부위를 함유하는 pEZX-E2F3 luciferase construct를 이용하여 miR-199a-5p의 유사체를 도입하였을 때 E2F3 리포터 활성이 감소하였고, 저해제를 도입하였을 때는 E2F3의 단백질 양과 리포터의 활성이 증가했다 (Fig. 3B). 또한, 프로토포르피린에 의하여 E2F3의 단백질 양이 3종의 중간엽성 간암 세포주에서 감소했다 (Fig. 3C). miR-199a-5p 억제제는 E2F3 및 HIF-1 $\alpha$ 의 단백질 레벨을 증가시켰으나 프로토포르피린 처리시에는 증가폭이 낮게 나타났다 (Fig. 3D). 이상의 결과는 간세포암 모델에서 miR-199a-5p의 감소가 E2F3의 번역을 촉진하며, 프로토포르피린에 의한 E2F3 및 HIF-1 $\alpha$ 의 억제는 miR-199a-5p를 경유함을 시사한다.



**Figure 4** Western blot and bar graphs showing the effect of PPIX on E2F3 and HIF-1α protein levels. The Western blot shows E2F3, HIF-1α, and β-actin levels in HepG2 cells treated with PPIX (+/-) and transfected with Anti-NC or Anti-miR-199a-5p. The bar graphs show the relative protein levels of E2F3 and HIF-1α. In both cases, PPIX treatment increases protein levels, and this increase is significantly inhibited by Anti-miR-199a-5p (\* $P < 0.01$ ).

**Figure 3. Inhibition of de novo synthesis of E2F3 by either miR-199a-5p or PPIX treatment**

(A) An integrative network using putative targets of miR-199a-5p, miR-519d, and miR-20b affected by PPIX. Sub-networks were grouped and each subset core gene was bordered and colored differently.

(B) Luciferase assays for E2F3 3'-UTR. Indicated cells were transfected with control mimic (or anti-NC) or miR-199a-5p mimic (or anti-miR-199a-5p) in combination with E2F3 3'-UTR reporter construct.

(C) Inhibition of E2F3 expression by PPIX treatment. Immunoblottings were performed on the lysates of SK-Hep1 cells treated with 3  $\mu$ M PPIX for the indicated time (upper). SNU878 or SNU449 cells were incubated with 3  $\mu$ M PPIX for 3 h (lower).

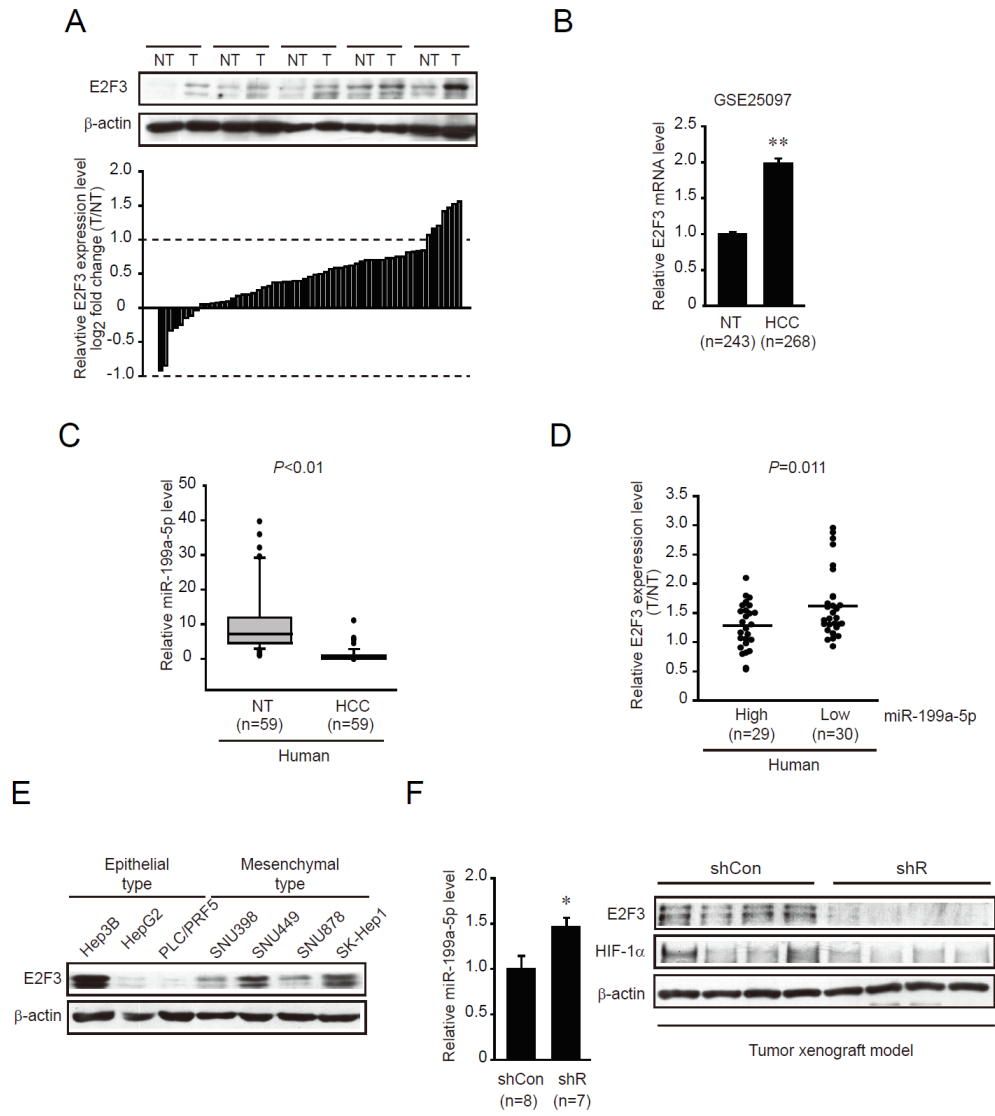
(D) The expression of E2F3 and HIF-1 $\alpha$  after transfection of anti-miR-199a-5p on HepG2 cells were treated with 3  $\mu$ M PPIX for 3 h after transfection with anti-NC (control) or anti-miR-199a-5p for 72 h (left). The band intensities of E2F3 or HIF-1 $\alpha$  relative to  $\beta$ -actin were quantified by scanning densitometry of the immunoblots (right). The data represent the mean  $\pm$  S.E. from 3 different independent experiments (significantly different from vehicle-treated control, \*P < 0.05; N.S., not significant).



#### 4. 인간 간세포암 및 종양 이식 동물 모델에서의 E2F3 증가

본 연구에서 도출한 E2F3와 마이크로RNA간의 임상적 연관성을 규명하고자, E2F3와 마이크로RNA의 발현양을 간세포암(HCC)과 이에 대응하는 주변 정상 조직(non-tumorous tissue, NT)에서 관찰하였다. 주변 정상 조직에 비하여 간세포암에서 E2F3의 단백질 양이 증가되어 있음을 관찰하였고 (Fig. 4A), GEO 데이터베이스(GSE25097)에서도 E2F3의 mRNA 레벨 증가를 확인하였다 (Fig. 4B). 동일한 인간 간세포암 시료에서 miR-199a-5p의 레벨은 유의적으로 감소하였다. miR-199a-5p의 레벨이 높고 낮음에 따라 E2F3와의 상관관계를 관찰한 결과, miR-199a-5p가 감소한 환자군에서 E2F3의 단백질 양 증가가 나타난 것으로 미루어볼 때 miR-199a-5p와 E2F3 간의 역상관계를 확인할 수 있었다 (Fig. 4C, D). E2F3의 단백질 양은 상피성 간암 세포주와 비교해 볼 때 중간엽성 간암 세포주에서 대체적으로 높게 나타났기 때문에 간암의 악성화에 E2F3가 영향이 있음을 시사한다 (Fig. 4E).

상피-중간엽성 이행을 나타내기 위하여, SK-Hep1에서 Gα12의 발현을 저해시킨(sh-Gα12-SK-Hep1) 세포를 경피로 주입한 동물 모델을 도입하여 (Yang et al. 2015b, Yang et al. 2015a) miR-199a-5p와 E2F3와 HIF-1α의 레벨을 관찰하였다. 이 모델에서 miR-199a-5p의 레벨이 증가되었으며 E2F3와 HIF-1α의 단백질 양은 감소하였다 (Fig. 4F). 이상의 결과는 간세포암에서 miR-199a-5p의 감소는 악성화에 기여하는 것을 시사한다.



**Figure 4. Identification of E2F3 as a novel target of miR-199a-5p**

(A) The levels of E2F3 protein in human HCC specimens. Immunoblottings for E2F3 were done on 59 pairs of primary HCCs (T) and their adjacent non-tumor liver tissues (NT). A log2 fold change more than 1 or less than -1 was considered overexpression or suppression. Equal loading of proteins was confirmed by immunoblottings for  $\beta$ -actin.

(B) Relative E2F3 mRNA levels in a large cohort GEO database of HCC. Data represents the mean  $\pm$  S.E. (significantly different from NT, \*\*P < 0.01).

(C) Relative miR-199a-5p levels in human HCC specimens (N= 59, in each group).

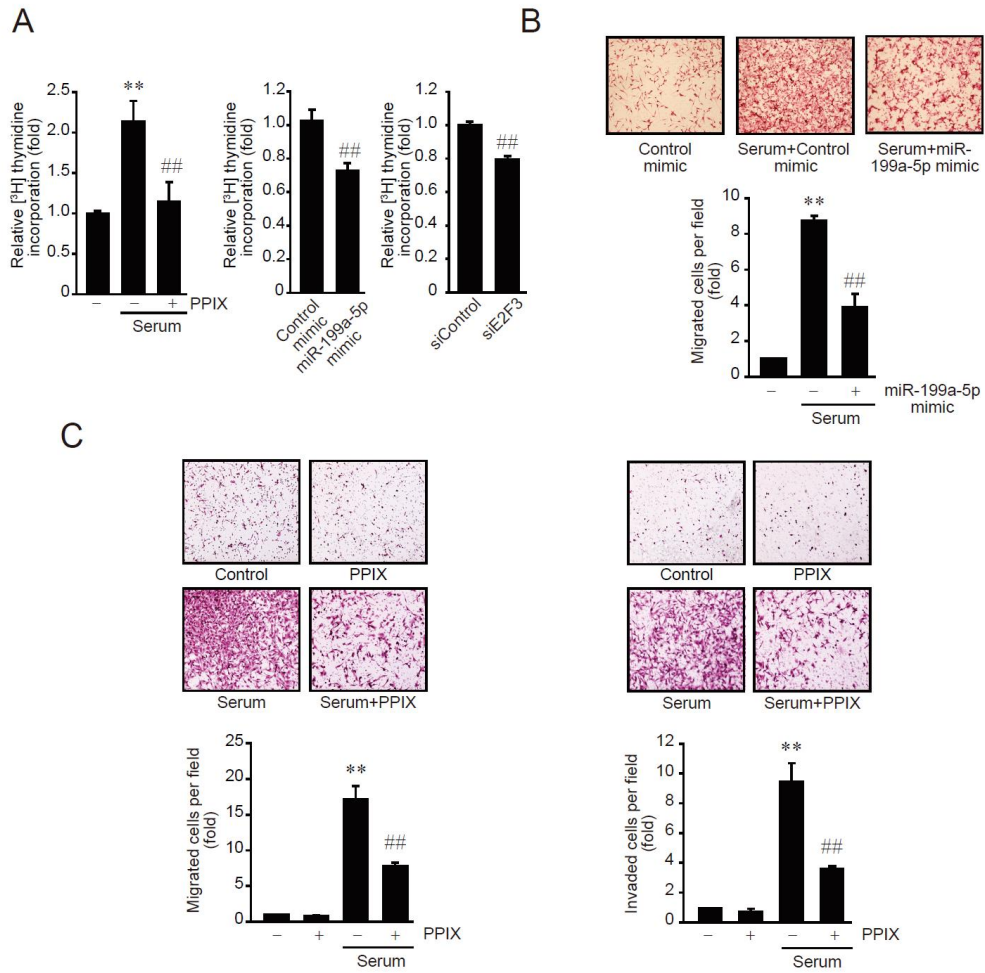
(D) Inverse relationship between E2F3 expression and miR-199a-5p levels in HCC and adjacent NT tissues. The levels of E2F3 were separated into miR-199a-5p high and low expression by the median value. Symbols represent individual samples.

(E) Immunoblottings for E2F3 in epithelial and mesenchymal liver tumor cell lines.

(F) The tumors formed in each group at 10 weeks. Relative miR-199a-5p and E2F3 protein levels in mesenchymal tumor xenografts. miR-199a-5p levels were measured using qRT-PCR assays (left). The data represent the mean  $\pm$  S.E. (significantly different from shCon, \*P < 0.05). Representative immunoblottings for E2F3 and HIF-1 $\alpha$  are shown (right). shR represents G $\alpha$ 12-depletion using a shRNA approach in a SK-Hep1-xenograft model.

## 5. 프로토포르피린에 의한 암세포 증식 및 침습성/이동성 억제

E2F3는 세포의 증식에 영향을 미친다고 보고되었기 때문에 (Humbert et al. 2000, Oeggerli et al. 2004), 종양세포의 성장에 대한 프로토포르피린의 효과와 miR-199-5p 유사체를 통한 이의 억제를 관찰하였다. 세포의 증식을 관찰하기 위하여 SK-Hep1 세포주에서 [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine을 이용하여 DNA 합성 속도를 측정하였다. 혈청 처리로 [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine의 합성량이 대조군에 비하여 2배 이상 증가되었으며, 프로토포르피린을 처리하자 혈청에 의한 증가 효과가 나타나지 않았다 (Fig. 5A). miR-199a-5p 유사체 도입과 E2F3 발현 저해시에도 [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine의 합성량이 감소한 것으로 미루어 볼 때 E2F3가 중간엽성 간세포암 증식에 영향을 주고 있음을 나타낸다 (Fig. 5A). 이는 프로토포르피린의 중간엽성 간세포암 성장 억제를 시사한다. 다음으로, miR-199a-5p의 증가가 암세포 증식 억제 외에도, 침습성/이동성에도 영향을 미치는지 관찰하기 위하여 실험을 수행한 결과 프로토포르피린과 miR-199a-5p 유사체가 중간엽성 간암 세포주의 침습과 이동을 모두 억제하였다 (Fig. 5B, C). 그러므로 miR-199a-5p는 악성화된 간암세포의 증식 및 침습성/이동성을 억제한다.



**Figure 5. The effects of PPIX on cell proliferation and migration/invasion**

(A) Inhibition of DNA synthesis by PPIX treatment, miR-199a-5p mimic or siE2F3 transfection. The rate of SK-Hep1 cell proliferation was measured using the [methyl-3H]-thymidine incorporation assay. DNA synthesis rate was determined in SK-Hep1 cells pre-treated with 3  $\mu$ M PPIX for 16 h in the presence or absence of 5% fetal bovine serum. The cells were also transfected with control mimic (or siRNA), miR-199a-5p mimic (48 h), or siE2F3 (72 h), and were continuously incubated in a medium containing 5% serum for 16 h.

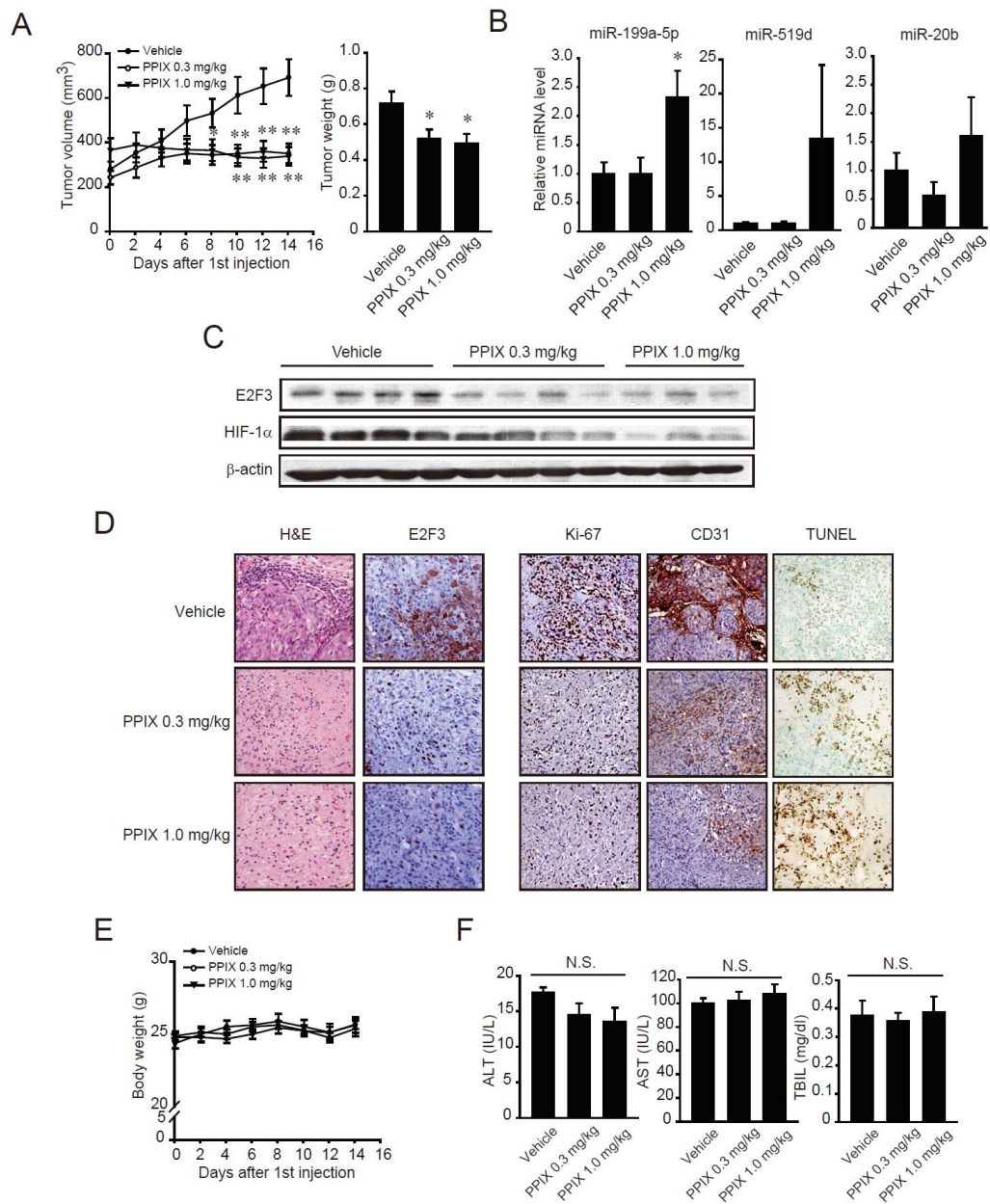
(B) Inhibition of cell migration by miR-199a-5p. SK-Hep1 cells were transfected with control miR or miR-199a-5p mimic for 48 h, and were subjected to transwell migration assays in a medium with or without fetal bovine serum for 16 h.

(C) Inhibition of cell migration and invasion by PPIX treatment. Migrated/invaded cells were examined using light microscopy (magnification,  $\times 200$ , upper). Numbers of migrate/invaded cells per field were counted and quantified (lower). For A–C, value represents the mean  $\pm$  S.E. from 3 independent experiments (treatment mean significantly different from vehicle-treated control,

\*\*P < 0.01, or serum, ##P < 0.01).

## 6. 종양 이식 동물실험

중간엽성 간암 세포주인 SK-Hep1 세포를 경피로 누드마우스에 주입한 후, 대조군(vehicle)과 프로토포르피린을 2주간 격일로 경구투여 하며 종양의 크기와 최종 종양 무게를 관찰하였다. 프로토포르피린을 0.3 mg/kg와 1.0 mg/kg 주입한 동물 모델에서 유의적으로 종양의 크기 및 무게가 감소하였으며 (Fig. 6A), 1.0 mg/kg를 주입한 동물에서 miR-199a-5p의 레벨이 유의적으로 증가하였다 (Fig. 6B). E2F3와 HIF-1 $\alpha$ 의 단백질 양 또한 프로토포르피린 처치에 의하여 감소 하였다 (Fig. 6C). 또한, 면역화학분석을 통해 각 군에서의 E2F3의 발현과, 세포증식 지표인 Ki67, 혈관신생 지표인 CD31을 관찰한 결과에서도 프로토포르피린에 의한 억제 효과가 잘 나타났다 (Fig. 6D). TUNEL 염색 결과에서는 프로토포르피린에 의하여 세포 자멸이 증가했다 (Fig. 6D). 본 실험에 사용한 프로토포르피린 농도에서는 종양이식 쥐의 체중 감소가 나타나지 않았으며, 간손상 지표인 ALT, AST 와 빌리루빈 레벨의 증가가 나타나지 않았으므로 독성은 나타나지 않음을 의미한다 (Fig. 6E, F). 이상의 결과에서 중간엽성 간암세포에서의 miR-199a-5p증가와 E2F3, HIF-1 $\alpha$  억제는 종양 성장을 저해시키는 항암효과를 나타내는 것으로 해석된다.





### **Figure 6. Inhibition of xenograft tumor growth by PPIX**

(A) Inhibition of tumor growth by PPIX treatment. Tumor volumes of tumors originated from SK-Hep1 were measured every other day with vehicle or PPIX treatment as described in the methods section. The mice were sacrificed on day 14 after PPIX treatment, and the excised tumors were weighed. Value represents the mean  $\pm$  S.E. (N= 8 or 9 in each group, significantly different from vehicle treatment group, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, Student's t-test).

(B) qRT-PCR assays for miR-199a-5p, miR-519d, and miR-20b in xenograft tumors. Obtained tumors were subjected to analyses. Data represents the mean  $\pm$  S.E (treatment mean significantly different from vehicle-treated control, \*P < 0.05).

(C) Representative immunoblottings for E2F3 and HIF-1 $\alpha$  in the tumor samples.

(D) Representative hematoxylin and eosin (H&E) staining, immunohistochemistry for E2F3, Ki-67 and CD31, and TUNEL assays ( $\times 200$ , representative figures were shown; N= 4 in each group).

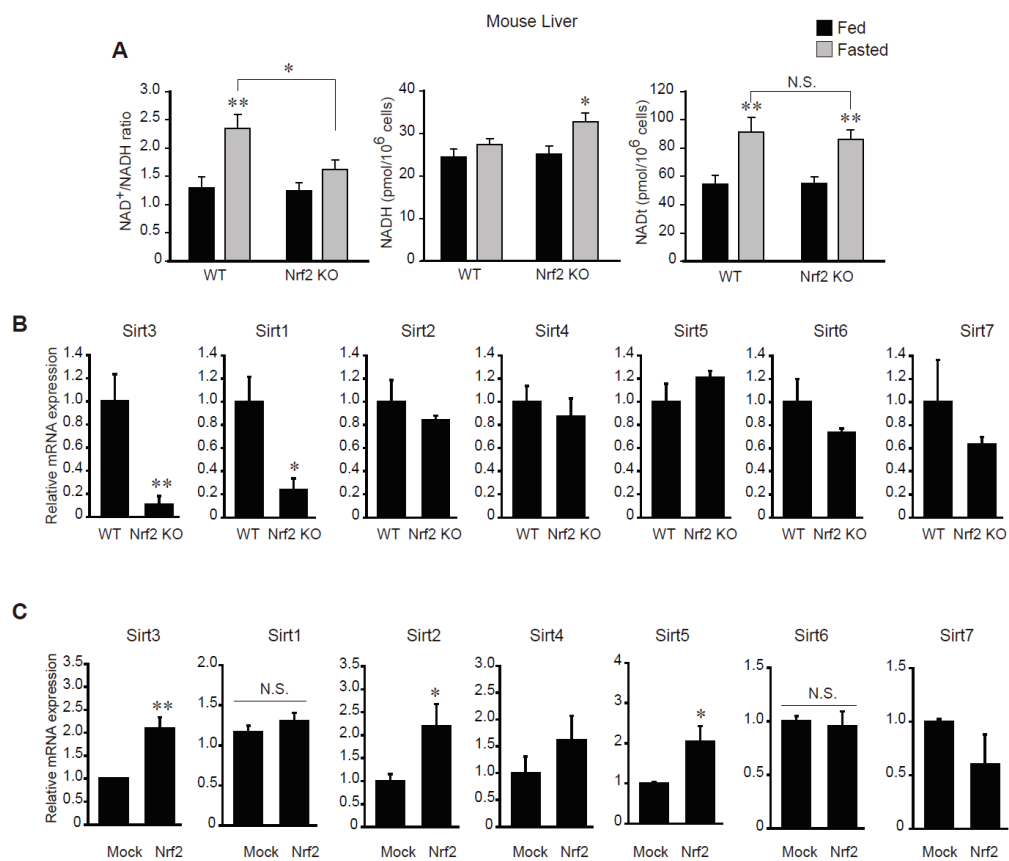
(E) Body weight curves after PPIX treatment at the dose of 0.3 or 1.0 mg/kg body weight for every other day.

(F) Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) activities, and total bilirubin content (TBIL) in serum after PPIX treatments (N.S., not significant).

## II. Nrf2에 의한 간세포 손상 억제

### 1. Nrf2에 의한 미토콘드리아 특이적 Sirt3 유전자 발현 조절

미토콘드리아 생합성 조절인자인 PGC-1 $\alpha$ 에 의하여 조절되는 유전자 중에는 탈아세틸화효소가 있다 (Wu et al. 1999). 특히 Sirt는 미토콘드리아의 생합성, 산소 소비 및 ATP생성에 관여한다 (Hallows et al. 2006, Michan and Sinclair 2007). 위의 실험에서 Nrf2는 미토콘드리아의 기능 향상 및 생합성에 관여하는 분자들을 조절하였기 때문에 Sirt family에도 영향을 줄 것으로 예상하였다. 단식 쥐 모델에서 NAD<sup>+</sup>/NADH ratio의 증가가 나타나는데 이는 NAD<sup>+</sup> 증가에 의한 것이다 (Hirschey et al. 2010). 이 때 NAD<sup>+</sup> 의존적 탈아세틸화효소로 작용하는 Sirt 레벨이 증가된다 (Hallows et al. 2006). Nrf2의 결손은 단식 상황에서 NAD<sup>+</sup>/NADH ratio의 증가가 더 이상 나타나지 때문에 Sirt와의 연관성을 지지한다 (Fig 7A). Sirt family의 mRNA 레벨을 Nrf2 결손 마우스의 간에서 관찰한 결과 Sirt1과 Sirt3의 억제가 유의적으로 나타났다 (Fig. 7B). Nrf2를 과발현 했을때에는 Sirt2, Sirt3, Sirt5의 증가를 보였기 때문에 Nrf2의 유무에 따른 공통적인 조절인자는 Sirt3일 것으로 예상된다 (Fig. 7C).



**Figure 7. Nrf2 dependent Sirt expressions**

(A) NAD<sup>+</sup>/NADH ratio, NADH and total NAD<sup>+</sup> contents on fed/fasted model. Livers of WT and Nrf2 KO mice are compared before or after 24 hour fasting (N=3, in each group).

(B) Relative mRNA levels of Sirt1-7 for WT and Nrf2 KO mice (N=4, in each group).

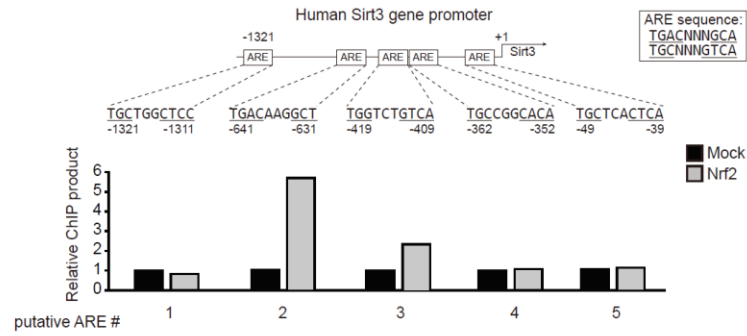
(C) Relative mRNA levels of Sirt1-7 of HEK293a cells transfected with Mock or Nrf2.

The data represent the mean  $\pm$  S.E. (significantly different compared to WT or mock-transfected control, \*p<0.05 or \*\*p<0.01).

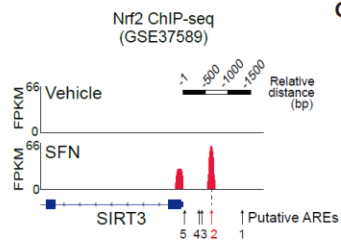
## 2. Nrf2에 의한 Sirt3의 전사조절

Nrf2 신호와 Sirt3 유전자간의 상관성을 바탕으로 Sirt3 유전자 발현 조절에 Nrf2가 미치는 영향을 알아보았다. 전사적 조절 가능성을 알아보기로 Sirt3 유전자 프로모터 부위를 분석한 결과 Nrf2가 결합할 수 있는 antioxidant response element (ARE) 서열(sense, 5'-TGATAAGGCACTTCCAGGTTG-3'; and antisense, 5'-GCTGCCCCCTTATCAGATGACT-3', 212 bp) 이 존재 하였다. ChIP 실험 결과 Nrf2는 Sirt3 프로모터에 존재하는 ARE 부위에 결합하는 것이 관찰 되었다 (Fig. 8A). 이러한 현상은 GEO 데이터베이스(GSE37589)를 통하여 분석한 Nrf2 ChIP-seq 결과로도 지지된다 (Fig. 8B). 또한 pGL3-Sirt3-ARE luciferase 리포터 결과에서도 Nrf2 과발현에 의하여 Sirt3 유전자 프로모터의 활성이 증가하며 이 ARE 서열을 변이 시켰을 때는 이 현상들이 나타나지 않음을 확인하였다 (Fig. 8C). PGC-1 $\alpha$ 은 NAD<sup>+</sup> 의존적 탈아세틸화 효소인 Sirt3가 작용함으로써 탈아세틸화 및 활성화 된다고 보고되었다. 단식 쥐 모델에서 Sirt3의 단백질 양이 증가하고 이에 따른 PGC-1 $\alpha$ 의 증가를 보였다. 그러나 Nrf2가 결손된 쥐에서는 이러한 현상이 나타나지 않으며 탈아세틸화 현상도 없었다 (Fig. 8D). 이상의 결과는 Nrf2에 의한 Sirt3 발현 조절 가능성을 시사하며, Nrf2는 Sirt3의 전사인자로 작용하여 PGC-1 $\alpha$ 의 탈아세틸화에 기여한다.

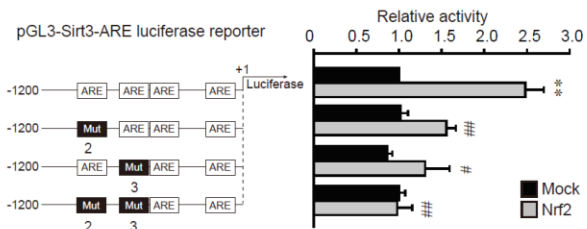
**A**



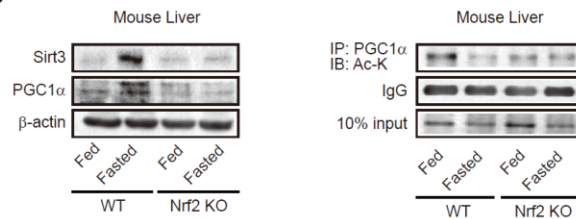
**B**



**C**



**D**



**Figure 8. Sirt3 induction by Nrf2 as a transcription factor**

(A) ChIP assays of Nrf2 binding Sirt3 gene promoter (N=2).

(B) Nrf2 Chip-seq (GSE37589) analysis for Sirt3 promoter.

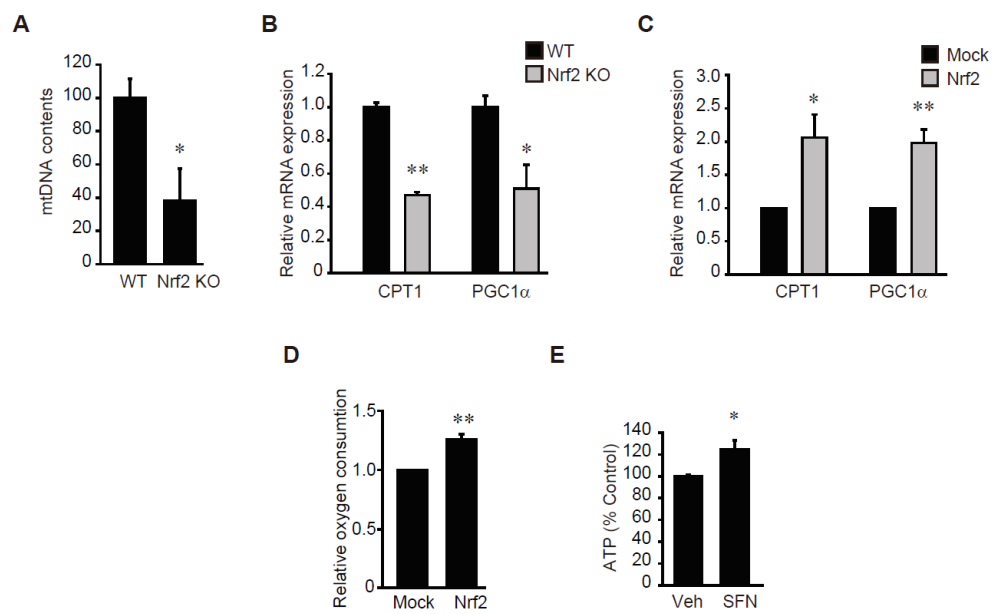
(C) Sirt3-ARE luciferase reporter activity after Nrf2 activation.

(D) Nrf2 dependent effects of fasting on Sirt3 activation. Immunoblottings of Sirt3 and PGC-1 $\alpha$  levels in liver lysates and immunoprecipitation of PGC-1 $\alpha$  protein acetylated on lysine residue. Control blots are indicated as 10% input.

### 3. Nrf2에 의한 미토콘드리아 기능 조절

Nrf2는 전사인자로서 항산화와 세포 생존에 기인하는 유전자를 조절하기 때문에 (Kobayashi et al. 2004, Itoh et al. 1999), Nrf2의 결손이 미토콘드리아의 기능 및 형태학적 변화에 어떠한 영향을 주는지 관찰하였다. 소포체 스트레스의 증가는 미토콘드리아의 활성 및 기능 억제를 지지한다. Nrf2가 결손됐을 때 미토콘드리아 DNA의 양이 감소하였으며 (Fig. 9A) 미토콘드리아 활성과 연료 산화 지표인 CPT1과 PGC-1 $\alpha$  또한 유의적인 감소를 확인하였다 (Fig. 9B). 반대로 세포 모델에서 Nrf2를 과발현 했을 때는 위의 지표들의 증가가 유의적으로 나타났으며, 산소 소비량이 증가하였다 (Fig. 9C). Nrf2의 활성화제인 sulforaphane을 처리하였을 때 ATP가 증가하였다 (Fig. 9D). 이러한 결과는 소포체 스트레스 반응 억제에 Nrf2가 기여하며 미토콘드리아 활성에 기여함을 제시한다.





**Figure 9. Nrf2 regulates mitochondrial function**

(A) Mitochondria DNA contents level was measured by qRT-PCR assays using primers for the mtDNA region cytochrome c oxidase subunit II (COXII) and were normalized against nuclear-encoded receptor-interacting protein 140 (RIP140).

(B) Relative mRNA levels of CPT1 and PGC-1 $\alpha$  in WT and Nrf2 KO mice (N=3, in each group) were measured using qRT-PCR assays.

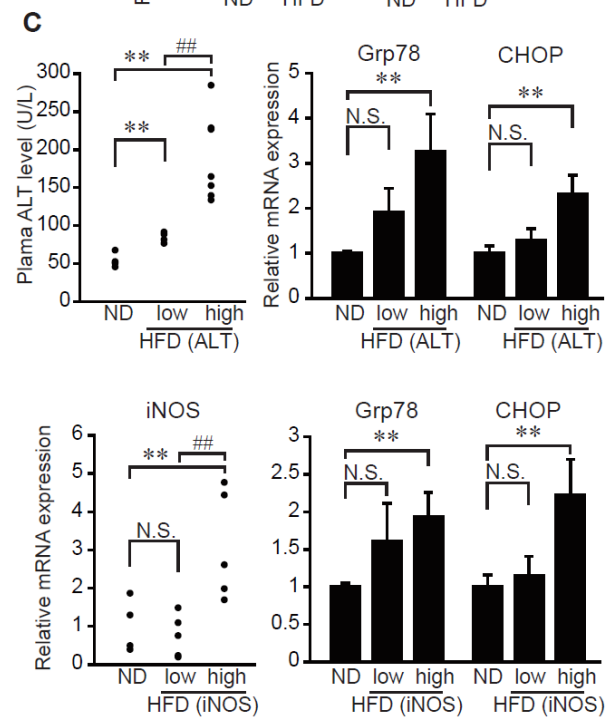
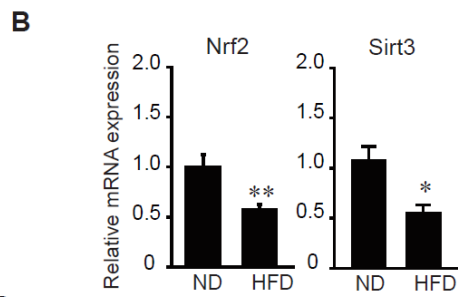
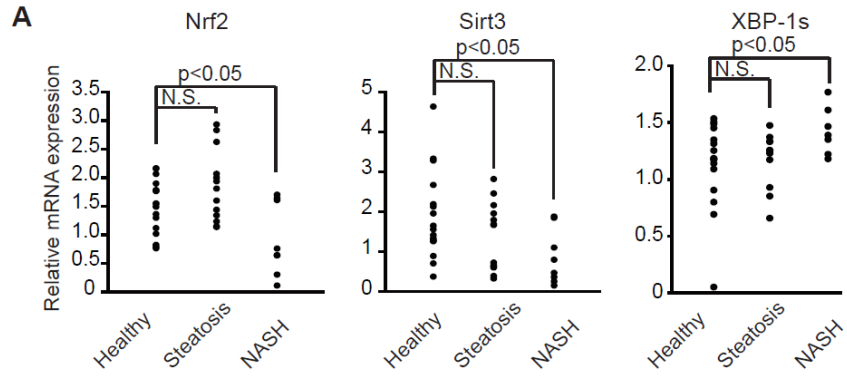
(C) Relative mRNA levels of CPT1 and PGC-1 $\alpha$ . AML12 cells were transfected with Mock or Nrf2.

(D) Nrf2 effect on cellular oxygen consumption. AML12 cells were transfected with Nrf2.

(E) Effect of sulforaphane (10  $\mu$ M, 24 h) in ATP generation. The data represent the mean  $\pm$  S.E. (significantly different compared to vehicle-treated or mock-transfected control, \*p<0.05 or \*\*p<0.01).

#### 4. 인간 및 동물 지방간 모델에서의 Nrf2 및 Sirt3 감소

지방간염 및 비만 환자의 간조직에서 소포체 스트레스가 증가되어 있다는 보고를 바탕으로 (Lee et al. 2012, Ozcan et al. 2004) 간지방증 및 비알콜성 지방간 환자 샘플에서 소포체 스트레스 지표인 XBP-1의 mRNA를 관찰하였다. 비알콜성 지방간 환자에서 XBP-1의 레벨이 유의적으로 증가하였으며 같은 환자 샘플에서 Nrf2와 Sirt3는 감소하였다 (Fig. 10A). 소포체 스트레스와 비알콜성 지방간 생성의 상관관계를 규명하기 위하여 소포체 스트레스와 간세포 손상을 입은 동물모델을 도입하였다. 고지방식이를 한 동물에서 Nrf2와 Sirt3는 유의적으로 감소하였다 (Fig. 10B). 고지방 식이에 의해 ALT의 증가가 나타난 상위 50%의 쥐에서 소포체 스트레스의 분자 마커인 Grp78과 CHOP의 증가가 유의적으로 나타났다 (Fig. 10C). 또한 동일한 동물 샘플에서 염증 지표인 iNOS의 증가를 보였으며 이를 기준으로 나눈 상위 50%의 고지방식이 샘플에서도 Grp78과 CHOP의 증가를 보였기 때문에 (Fig. 10C), 소포체 스트레스와 간세포 손상 및 염증간의 양의 상관관계를 나타낸다.



**Figure 10. Increase of ER stress with NAFLD progression**

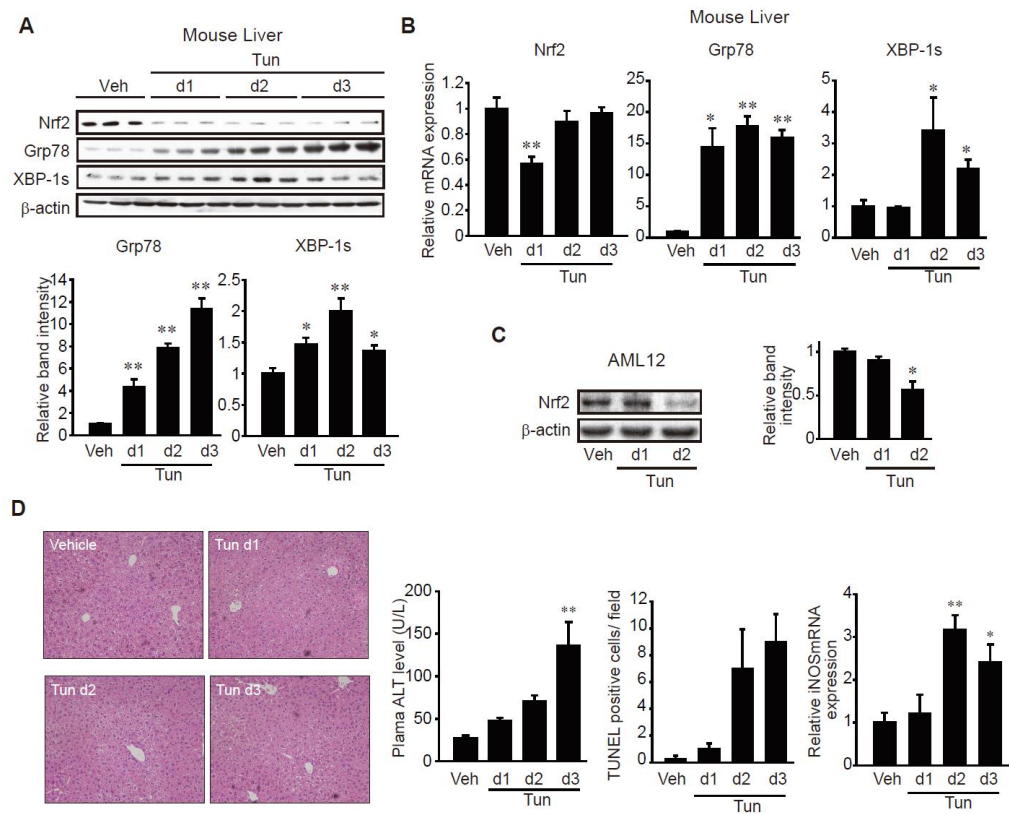
(A) Relative mRNA levels of Nrf2, Sirt3 and XBP-1s in human NAFLD patients. The mRNA levels were determined on the livers of healthy subjects (N=22), patients with simple steatosis (N=23), and steatohepatitis (N=10).

(B) Relative mRNA levels of Nrf2 and Sirt3 in the liver of mice fed on either a normal diet (ND, N=4) or 60% high-fat diet (HFD, N=15) for 8 weeks.

(C) Correlation between serum ALT and mRNA levels of ER stress markers in the liver of mice fed on either ND or HFD. Mice fed on HFD were divided into two groups, based on the median of plasma ALT level (upper) or liver iNOS mRNA expression (lower). The data represent the means  $\pm$  S.E. (significantly different compared to ND control, \* $p < 0.05$  or \*\* $p < 0.01$ ; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ).

## 5. 소포체 스트레스에 의한 간세포 손상에서의 항산화 인자 Nrf2의 역할

소포체 스트레스 유도 물질인 tunicamycin (2 mg/kg body weight, i.p.)이 항산화 유전자인 Nrf2의 발현에 어떠한 영향을 주는지를 단백질과 mRNA 레벨에서 관찰하였다. Tunicamycin을 투여하여 소포체 스트레스 및 간염을 유발한 쥐에서 1일, 2일, 3일째의 현상을 관찰한 결과, Nrf2의 단백질 감소는 3일간 지속되었으며 (Fig. 11A), mRNA는 1일째 감소된 후 다시 회복하였다 (Fig. 11B). 이러한 Nrf2의 감소는 마우스 간세포주인 AML12에서도 재현되었다 (Fig. 11C). 또한 동일한 동물 모델에서 간세포의 손상을 지표하는 ALT가 증가하였으며, 세포 사멸(TUNEL positive area)과 염증(iNOS)의 증가가 나타났다 (Fig. 11D). 이는 소포체 스트레스에 의한 간세포 손상에 있어 Nrf2가 중요한 역할을 할 것임을 시사한다.



**Figure 11. Nrf2 blocks tunicamycin-induced ER stress**

(A) Immunoblottings for Nrf2, Grp78, and XBP-1s and their quantification. Mice were treated with vehicle or tunicamycin (2 mg/kg) and sacrificed at indicated times (day 1-3) after single injection (N=3, in each group).

(B) Realtime PCR assays for Nrf2, Grp78 and XBP-1s. mRNA levels were normalized by  $\beta$ -actin.

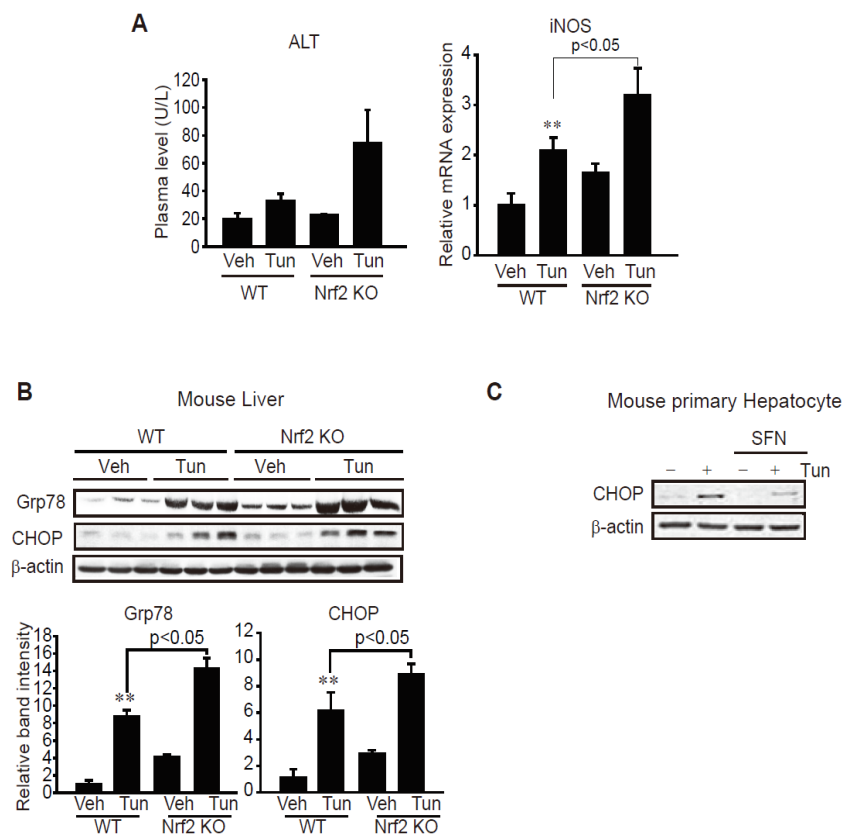
(C) Immunoblotting of Nrf2 after tunicamycin treatment (2 mg/ml) of AML12 (day 1 and 2).

(D) H&E staining of liver of mice after tunicamycin injection (left) and median of serum ALT level, TUNEL positive cells, and liver iNOS mRNA expression (right). The data represent the means  $\pm$ S.E. of at least three separate experiments (significantly different from vehicle-treated control, \* $p < 0.05$  or \*\* $p < 0.01$ ).



## 6. Nrf2 결손과 소포체 스트레스 유도제에 의한 소포체 스트레스 증가

Nrf2가 결손된 마우스에 tunicamycin 처치에 의한 소포체 스트레스가 가해지면 정상 마우스에 비하여 소포체 스트레스가 가증되는지 여부를 관찰하였다. 그 결과 간세포 손상 지표인 ALT와 염증 지표인 iNOS의 증가가 나타났다 (Fig. 12A). 소포체 스트레스 지표인 Grp78과 CHOP의 단백질 레벨 상승이 나타났다 (Fig. 12B). 정상 마우스의 간세포를 분리하여 Nrf2 유도제인 sulforaphane을 처리 했을 때는 tunicamycin에 의한 소포체 스트레스의 증가가 감소됨을 확인하였다 (Fig. 12C). 이 결과는 Nrf2가 소포체 스트레스를 해소하는데 중요한 역할을 함을 시사한다.



**Figure 12. ER stress on Nrf2 deficient mice**

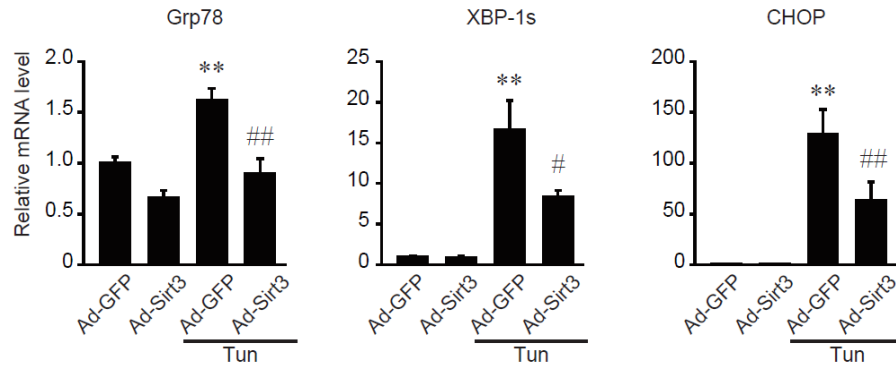
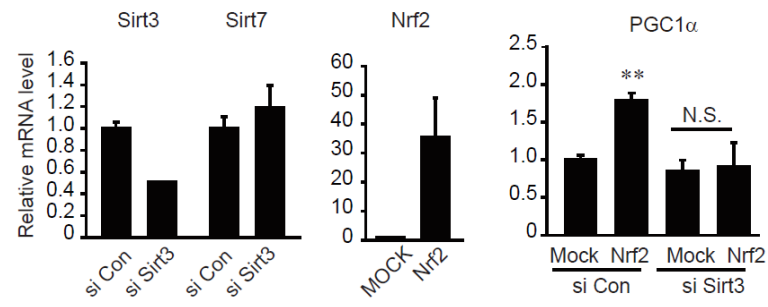
(A) Plasma ALT and mRNA level of iNOS. WT and Nrf2 KO mice were injected with tunicamycin (2 mg/kg). Mice were assayed 48 hours after single injection.

(B) Immunoblottings for ER stress markers in mouse liver. Protein levels of Grp78 and CHOP were compared between WT and Nrf2 KO mice.

(C) Protein levels of CHOP in primary hepatocytes. Primary hepatocytes were treated with tunicamycin (2 mg/ml, 24 h) after pretreatment of sulforaphane (10  $\mu$ M, 1 h). The data represent the means  $\pm$ S.E. of at least three separate experiments (significantly different from vehicle-treated control, \* $p$ <0.05 or \*\* $p$ <0.01).

## 7. 소포체 스트레스에서 Sirt3 유전자의 역할

진핵세포에서 미토콘드리아와 소포체는 그 구조와 기능면에서 밀접한 연관성을 가지고 있다 (Pitts et al. 1999, Shore and Tata 1977, Meier, Spycher and Meyer 1981). Sirt3는 미토콘드리아 특이적 유전자로써 미토콘드리아 기능과 세포 생존에 핵심적인 역할을 하기 때문에 (Hirschey et al. 2010, Kong et al. 2010) Sirt3가 소포체와 미토콘드리아간의 신호 조절하는지 여부를 관찰하였다. 세포에 아데노바이러스를 통하여 Sirt3를 감염 시켰을 때는 tunicamycin에 의한 소포체 스트레스 지표의 감소를 보였다 (Fig. 13A). 더 나아가 Sirt3의 결핍은 Nrf2를 통한 미토콘드리아 기능 향상을 막는 역할을 하였다 (Fig. 13B). 그러므로 이상의 결과는 Nrf2가 소포체 스트레스를 억제하는데 기여하며 미토콘드리아 기능 및 생합성을 Sirt3 의존적으로 증가시킴을 제시한다.

**A****B**

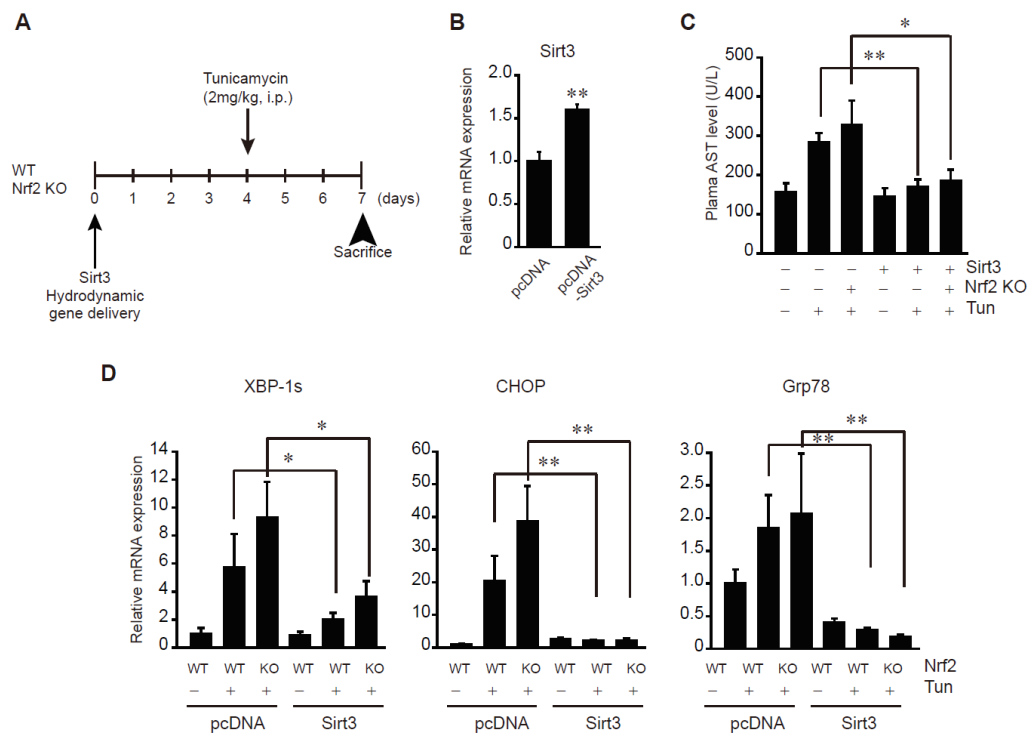
**Figure 13. Sirt3 blocks tunicamycin-induced ER stress**

(A) Relative mRNA levels of ER stress markers. AML12 cells were infected with adeno GFP or Sirt3 for 24 hours and tunicamycin (2 mg/ml, 15 h) was treated.

(B) Relative mRNA levels of Sirt3, Sirt7, Nrf2 and PGC-1 $\alpha$  were measured using qRT-PCR assays. Cells were co-transfected with Nrf2 and si Sirt3. The data represent the means  $\pm$ S.E. of at least three separate experiments (significantly different from Ad-GFP or siCON control, \* $p$ <0.05 or \*\* $p$ <0.01, or Ad-GFP treated with tunicamycin, ## $p$ <0.05 or ### $p$ <0.01).

## 8. Sirt3 유전자 전달에 의한 소포체 스트레스 및 간 손상 억제

소포체 스트레스 유도를 통한 간질환에서 Sirt3와 Nrf2가 관련 신호 조절에 미치는 영향을 동물모델에서 탐구하고자 유체역학을 이용한 유전자 주입법을 도입하였다 (Suda and Liu 2007). 정상 쥐와 Nrf2 결손 쥐에 pcDNA 또는 Sirt3 플라스미드를 꼬리정맥에 주입 후 4일뒤에 tunicamycin을 복강투여 하였고 (Fig. 14A), 간에서의 Sirt3 mRNA 레벨을 관찰하여 Sirt3의 유전자 주입 유무를 확인하였다 (Fig. 14B). Nrf2 결손 쥐에 tunicamycin을 주입하고 3일이 경과한 후 약 60%의 치사율이 나타났으나 Sirt3 플라스미드를 정맥으로 주입 후 tunicamycin을 처치한 쥐의 생존률은 100%로 나타났다 (Data not shown). 이는 Sirt3와 Nrf2의 유무가 소포체 스트레스에 의한 간세포 사멸에 영향을 미칠 뿐만 아니라 쥐의 생존에도 영향을 미쳤음을 시사한다. 또한 이 모델에서 Sirt3의 도입은 간 및 세포 손상을 지표하는 AST를 유의적으로 감소 시켰으며 (Fig. 14C), 소포체 스트레스 지표인 XBP-1s, CHOP, Grp78의 mRNA 및 단백질 발현 억제에도 기여했다 (Fig. 14D).





**Figure 14. Inhibition of ER stress by hydrodynamic gene delivery of Sirt3 on Nrf2-deficient mice**

(A) pcDNA or pcDNA-Sirt3 plasmid were delivered on WT and Nrf2 KO mice using hydrodynamic gene delivery and tunicamycin (2 mg/kg, i.p.) was treated three days before sacrifice.

(B) Relative mRNA level of Sirt3 after hydrodynamic gene delivery of pcDNA or pcDNA-Sirt3.

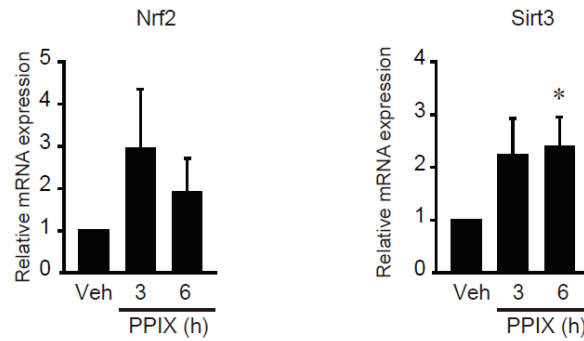
(C) Plasma AST levels of WT and Nrf2 KO mice with indicated treatment or gene delivery.

(D) qRT-PCR assays for XBP-1s, CHOP, and Grp 78. The data represent the means  $\pm$ S.E.

(\* $p < 0.05$  or \*\* $p < 0.01$ ).

## 9. Nrf2 활성 후보물질에 의한 Sirt3 증가

Nrf2 활성 후보물질인 프로토포르피린이 Sirt3의 발현에 있어서 미치는 영향을 관찰하였다. AML12 세포주에 프로토포르피린을 3시간 또는 6시간 처리한 결과 Sirt3의 mRNA 레벨이 증가하는 경향을 보였다. 특히 6시간에서 Sirt3의 증가가 유의적이므로 (Fig. 15), Nrf2의 활성물질에 의한 Sirt3의 증가는 소포체 스트레스에 의한 간세포 손상 방어에 기여할 수 있음을 의미한다.



**Figure 15. Induction of Sirt3 by a candidate of Nrf2 activator**

Relative mRNA levels for Nrf2 and Sirt3 after treatment of PPIX with indicated time (significantly different from vehicle, \* $p < 0.05$ ).

## IV. 고찰

본 연구에서는 Nrf2가 간세포암의 진행을 억제하며 세포 에너지 대사 조절을 통하여 세포 보호작용의 기전을 규명하였다. Nrf2는 타겟 항산화 유전자를 활성화 시키며 화학적 Nrf2의 활성화제는 항암효과에 기여한다 (Sporn and Liby 2012, Fahey et al. 2002, Gills et al. 2006, Kensler and Wakabayashi 2010).

중간엽성 간세포암 유래 SK-Hep1에 프로토포르피린을 처리하였을 때 Nrf2의 활성화에 기여하며 HIF-1 $\alpha$ 의 억제를 통한 항암 효과를 보였다. 예비 연구 결과에서도 상피 대장암 세포주인 HCT116에 Nrf2를 과발현 했을 때 CoCl<sub>2</sub> 유도성 HIF-1 $\alpha$  활성화 및 전사활성능이 감소하였기 때문에 (unpublished data) 이는 프로토포르피린에 의한 Nrf2 신호 활성화가 HIF-1 $\alpha$  억제에 관여함을 지지한다.

간종양 세포와 근섬유아세포에서 Nrf2의 억제는 E-cadherin 레벨이 낮을 때 Smad 타겟 유전자인 PAI-1과 slug를 증가시키고 Smad 신호 의존적 종양 세포의 이동능 증가 및 상피-중간엽성 이행 효과는 보고되었다 (Oh et al. 2012, Rachakonda et al. 2010). 반면에 Nrf2는 악성화 형질을 증대시키며 TGF- $\beta$  신호에 의하여 촉진된다고도 보고되었다 (Arfmann-Knubel et al. 2015). 그러나 간세포암의 상피-중간엽성 이행에 있어서 Nrf2 활성화제의 역할에 대한 보고는 없다. 프로토포르피린 처리는 중간엽성 암세포의 형질을 나타내는

유전자인 vimentin, zeb1/2, snail, slug, twist를 억제 하였으므로 이는 상피-중간엽성 이행 형질을 갖는 암에 특이적으로 항암 효과를 보이는 것으로 사료된다.

HIF-1 $\alpha$ 와 p-glycoprotein은 양의 상관 관계가 있으며, 이들의 증가는 다중 약제 저항성에 기여한다 (Ding et al. 2010). 본 연구에서 프로토포르피린과 항암화학요법제인 doxorubicin과 cisplatin의 병용 처치는 중간엽성 간암 세포의 사멸에 상승 효과를 나타냈다. Doxorubicin과 cisplatin은 효능과 용량에 따른 부작용이 단점으로 보고 되었기 때문에 (Arany and Safirstein 2003, Singal et al. 2000), 프로토포르피린을 기존의 항암제와 병용하여 보조요법제로 활용하면 항암 효과를 증진 시킬 뿐만 아니라 부작용을 감소시킬 수 있음을 제시한다.

TargetScan과 miRanda 알고리즘을 통하여 HIF-1 $\alpha$ 의 mRNA 3'-UTR에 결합하는 miRNA를 도출 하였고, 그 중에서도 miR-199a-5p, miR-519d, miR-20b가 프로토포르피린에 의하여 증가됨을 밝혔다. miR-199a-5p는 가장 큰 증가를 보였고 이는 간에서 높게 나타나는 마이크로 RNA 중 하나로 알려져 있으며 간질환의 만성화에 의한 간암의 억제뿐만 아니라 소포체 스트레스에 의한 간질환에 대한 연구결과도 보고되었다 (Dai et al. 2013). Cisplatin에 의한 miR-199a-5p의 감소는 간암에서의 항암제 저항성을 나타내며 (Kong et al. 2012, Xu et al. 2012) miR-199a-5p의 도입은 doxorubicin의 효과를 높인다고 보고되어있다 (Fornari et al. 2010). 따라서 프로토포르피린에 의한 miR-199a-

5p의 증가는 항암제 저항성 개선 효과를 갖음을 의미한다. p53은 Drosha와 상호작용을 하며 pri-마이크로RNA에서 프리커서 형태로의 이행을 돕는다 (Suzuki et al. 2009). 프로토포르피린은 p53을 통하여 세포 사멸을 유도하는데 (Zawacka-Pankau et al. 2007) 이는 miR-199a-5의 프로세싱에 기여 할 가능성이 있다. 또한 Nrf2의 활성화는 마이크로RNA 조절에 기여한다 (Singh et al. 2013, Joo et al. 2013). 따라서 프로토포르피린은 Nrf2의 활성화에 기여하기 때문에 miR-199a-5p의 증가가 Nrf2의 직접적 조절을 통하여 나타날 가능성이 있음을 의미한다.

본 연구에서 miR-199a-5p의 타겟으로 E2F3와 HIF-1 $\alpha$ 를 제시하였다. 암세포는 저산소 적응 시스템을 통하여 지속적인 성장을 하며 악성화 된다. 저산소 상태에서는 호기성에서 혐기성 전환을 통하여 에너지 대사를 하는데 (Semenza 2007, Weljie and Jirik 2011) 이 때 HIF-1 $\alpha$ 가 활성화 되고 당 대사, 혈관신생에 관련된 유전자인 GLUT1과 VEGF 등 저산소 환경 적응에 필요한 유전자가 발현된다 (Ema et al. 1997, Zhang et al. 2006, Iyer et al. 1998, Weljie and Jirik 2011). E2F는 전사인자로서 세포의 생존과 사멸 및 분화에 기여한다 (Chong et al. 2009, Oeggerli et al. 2004). 여덟개의 E2F 중에서 E2F1-3는 전사 활성인자이며 나머지는 전사 억제인자이다 (Dimova and Dyson 2005). E2F3는 G1/S 전환을 조절하여 종양의 성장과 사멸을 활성화 한다 (Leone et al. 1999).

프로토포르피린은 miR-199a-5p의 증가를 유도하고 E2F3와 HIF-1 $\alpha$ 를 억제 하였으며 중간엽성 간세포암의 억제에 기여하였다. 도출된 HIF-1 $\alpha$ 를

타겟으로 하는 마이크로RNA 중에서 miR-18a/b를 제외하고는 E2F3 mRNA의 동일한 결합부위와 결합함을 밝혔다. 따라서 중간엽성 간암에 있어서 HIF-1 $\alpha$ 와 E2F3는 도출된 마이크로RNA를 통하여 공통된 역할을 할 수 있음을 시사한다. 또한, 종양이식 동물에 프로토포르피린을 투여한 군에서 이 유전자의 억제를 통한 암세포 증식 및 침습, 이동성 억제 효능을 보였다. 중간엽성 간세포암 유래 세포주에 항암화학요법제와 프로토포르피린을 병용으로 처리시 세포독성의 증가폭이 크게 나타났다. 이는 프로토포르피린에 의한 항암제 감수성 증가 및 세포독성 증가를 시사한다.

소포체 스트레스는 미접힘 단백질반응을 통한 보상기전으로 단백질 접힘과 소포체 관련 분해에 관여하는 유전자의 전사를 통하여 나타난다 (Wan and Jiang 2016, Sone et al. 2013, Ozcan and Tabas 2012). 또한, Nrf2는 해독과 세포의 생존에 관여하는 유전자의 프로모터에 위치한 ARE와 결합하여 유전자의 전사적인 활성시킨다 (Itoh et al. 1999). 그러므로 소포체 스트레스에 의한 Nrf2의 억제는 간세포 손상에 기여하며 비알콜성 간질환과 같은 질병의 발생을 유도한다 (Kensler et al. 2007). 소포체 스트레스의 초기 적응반응으로써 PERK와 Nrf2의 인산화를 통하여 세포의 생존에 기여하지만, 지속적인 소포체 스트레스는 Nrf2를 억제한다 (Cullinan and Diehl 2004). 소포체 스트레스에 의한 간세포 손상에서 Nrf2의 감소는 미토콘드리아 특이적 유전자인 Sirt3를 직접적으로 조절하였다. Sirt3 유전자를 마우스에 도입하였을때는 소포체 스트레스 유도물질에 의한 간 손상을 억제하였으며

Nrf2의 활성 후보물질인 프로토포르피린은 Sirt3를 증가시켰다. 이는 Nrf2에 의한 Sirt3의 조절이 미토콘드리아 에너지 대사에 영향을 주며 더 나아가 간세포의 세포의 생존과 사멸을 결정짓는 중요한 분자마커임을 의미한다.

소포체는 미토콘드리아와 물리적, 기능적으로 밀접한 관련이 있으며 세포의 생리와 생존에 영향을 미친다 (Pitts et al. 1999, Shore and Tata 1977, Meier et al. 1981). 미토콘드리아에서 기능을 하는 Bcl-2/Bax family는 소포체막에 결합하여 소포체와의 신호를 전달한다 (Certo et al. 2006). 과도한 소포체 스트레스가 지속될 때 caspase-12를 통한 caspase 신호의 연속 반응을 통하여 세포 사멸을 유도하고 결국 세포 자멸을 증가시킨다 (Nakagawa et al. 2000). 미토콘드리아에서 기능을 하는 Sirt family는 소포체 스트레스와 미토콘드리아 기능 장애를 조절 할 것으로 예상된다. 본 연구에서 소포체 스트레스의 조절자로 제시한 Nrf2-Sirt3 신호는 산화적 스트레스로부터의 미토콘드리아 보호 효과뿐 아니라 소포체 스트레스의 방어 기능이 있음이 확인되었다. 또한, Nrf2에 의한 Sirt3의 조절은 소포체 스트레스와 비접힘 단백질 반응을 억제함으로써 비알콜성 지방간 이행 등 간질환에 있어서 길항적 결정자의 역할을 할 것임을 시사한다. 더 나아가 세포 기관간의 상호작용은 대사물의 교환과 칼슘 신호, 세포 사멸 기전을 가능하게 한다. 본 연구에서 소포체 스트레스는 Sirt3의 레벨을 감소시켰으며, Sirt3의 감소는 소포체 스트레스에 의한 미토콘드리아 손상을 유도하였다. 이는 소포체 스트레스 상황에서 Nrf2는 Sirt3와 미토콘드리아 보전에 기능적 연관성이 있음을 증명하며



간질환 치료의 단서를 제시할 것으로 사료된다.

본 연구 결과에서 Nrf2의 활성 후보물질은 중간엽성 간암 세포주에서 miR-199a-5p를 증가를 통하여 중간엽성 간세포암의 진행을 억제하였고, 쥐 유래 간세포에 프로토포르피린을 처리 하였을 때 Sirt3의 증가가 나타났다. Nrf2 활성화에 의한 Sirt3의 전사적 활성화는 소포체 스트레스로부터 간 손상을 방어하기 때문에 상기 화합물에 의한 Nrf2 및 Sirt3 증가는 간세포 손상 억제 효능을 갖을 것임을 추론할 수 있다. 또한, JNK/AP1 신호에 의하여 miR-199a-5p의 레벨이 증가되고 이는 GRP78, IRE1a, 및 ATF6를 직접적으로 타겟하여 지속적인 소포체 스트레스와 세포 사멸을 막기 때문에 (Dai et al. 2013), Nrf2의 활성화에 기여하는 프로토포르피린은 Sirt3의 증가를 통한 소포체 스트레스로부터 간세포 손상 방어 가능성 이외에도, 다른 측면으로는 miR-199a-5p 증가시켜 소포체 스트레스로부터 간손상을 억제 할 수 있음을 예상할 수 있다.

결론적으로, 간세포암에서 Nrf2 활성 후보약물의 도입은 miR-199a-5p를 증가시키며 에너지 대사 및 혈관신생에 관련된 유전자를 활성화 시키는 HIF-1 $\alpha$ 와 세포 주기에 기여하는 E2F3를 억제하여 간질환의 만성화에 의한 간세포암의 발전을 억제하는 효능을 보였다. 간세포 손상에 있어 Nrf2의 활성화는 미토콘드리아 특이적 Sirt3를 직접적으로 조절하여 에너지 대사 및 소포체 스트레스로부터 세포 보호에 기여하였다. 이와같은 결과는 Nrf2 활성화 효과의 새로운 응용 가능성을 제시한다.

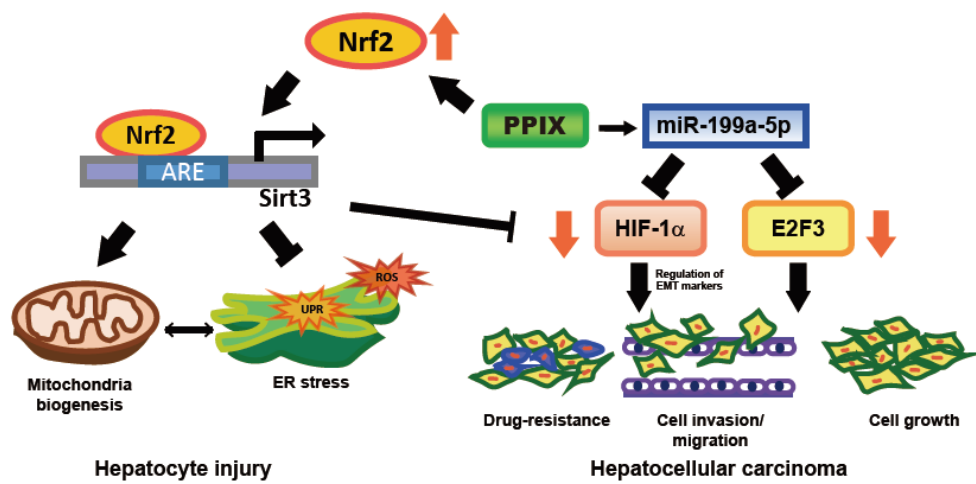


Figure 16. A schematic diagram illustrating the effect of Nrf2 activation in the liver

## V. 참고문헌

- Alpini, G., S. S. Glaser, J. P. Zhang, H. Francis, Y. Han, J. Gong, A. Stokes, T. Francis, N. Hugart, L. Hubble, S. M. Zhuang & F. Meng (2011) Regulation of placenta growth factor by microRNA-125b in hepatocellular cancer. *J Hepatol*, 55, 1339-45.
- Arany, I. & R. L. Safirstein (2003) Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol*, 23, 460-4.
- Arfmann-Knubel, S., B. Struck, G. Genrich, O. Helm, B. Sipos, S. Sebens & H. Schafer (2015) The Crosstalk between Nrf2 and TGF-beta1 in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Pancreatic Duct Epithelial Cells. *PLoS One*, 10, e0132978.
- Baltimore, D., M. P. Boldin, R. M. O'Connell, D. S. Rao & K. D. Taganov (2008) MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol*, 9, 839-45.
- Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-97.
- Braakman, I., J. Helenius & A. Helenius (1992) Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 11, 1717-22.
- Burroughs, A., D. Hochhauser & T. Meyer (2004) Systemic treatment and liver transplantation for hepatocellular carcinoma: two ends of the therapeutic spectrum. *Lancet Oncol*, 5, 409-18.
- Cermelli, S., A. Ruggieri, J. A. Marrero, G. N. Ioannou & L. Beretta (2011) Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*, 6, e23937.
- Certo, M., V. Del Gaizo Moore, M. Nishino, G. Wei, S. Korsmeyer, S. A. Armstrong & A. Letai (2006) Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, 9, 351-65.

- Cheng, J., L. Zhou, Q. F. Xie, H. Y. Xie, X. Y. Wei, F. Gao, C. Y. Xing, X. Xu, L. J. Li & S. S. Zheng (2010) The impact of miR-34a on protein output in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Proteomics*, 10, 1557-72.
- Chong, J. L., S. Y. Tsai, N. Sharma, R. Opavsky, R. Price, L. Wu, S. A. Fernandez & G. Leone (2009) E2f3a and E2f3b contribute to the control of cell proliferation and mouse development. *Mol Cell Biol*, 29, 414-24.
- Cullinan, S. B. & J. A. Diehl (2004) PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 279, 20108-17.
- Dai, B. H., L. Geng, Y. Wang, C. J. Sui, F. Xie, R. X. Shen, W. F. Shen & J. M. Yang (2013) microRNA-199a-5p protects hepatocytes from bile acid-induced sustained endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis*, 4, e604.
- Dimova, D. K. & N. J. Dyson (2005) The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*, 24, 2810-26.
- Ding, Z., L. Yang, X. Xie, F. Xie, F. Pan, J. Li, J. He & H. Liang (2010) Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136, 1697-707.
- Dolganiuc, A., J. Petrasek, K. Kodys, D. Catalano, P. Mandrekar, A. Velayudham & G. Szabo (2009) MicroRNA expression profile in Lieber-DeCarli diet-induced alcoholic and methionine choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis models in mice. *Alcohol Clin Exp Res*, 33, 1704-10.
- Doms, R. W., R. A. Lamb, J. K. Rose & A. Helenius (1993) Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology*, 193, 545-62.
- Ema, M., S. Taya, N. Yokotani, K. Sogawa, Y. Matsuda & Y. Fujii-Kuriyama (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4273-8.
- Fahey, J. W., X. Haristoy, P. M. Dolan, T. W. Kensler, I. Scholtus, K. K. Stephenson,

- P. Talalay & A. Lozniewski (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 7610–5.
- Fang, J. H., H. C. Zhou, C. Zeng, J. Yang, Y. Liu, X. Huang, J. P. Zhang, X. Y. Guan & S. M. Zhuang (2011) MicroRNA-29b suppresses tumor angiogenesis, invasion, and metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 expression. *Hepatology*, 54, 1729–40.
- Farrar, G. J., N. Chadderton, P. F. Kenna & S. Millington-Ward (2013) Mitochondrial disorders: aetiologies, models systems, and candidate therapies. *Trends Genet*, 29, 488–97.
- Fornari, F., M. Milazzo, P. Chieco, M. Negrini, G. A. Calin, G. L. Grazi, D. Pollutri, C. M. Croce, L. Bolondi & L. Gramantieri (2010) MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res*, 70, 5184–93.
- Giblin, W., M. E. Skinner & D. B. Lombard (2014) Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. *Trends Genet*, 30, 271–86.
- Gills, J. J., E. H. Jeffery, N. V. Matusheski, R. C. Moon, D. D. Lantvit & J. M. Pezzuto (2006) Sulforaphane prevents mouse skin tumorigenesis during the stage of promotion. *Cancer Lett*, 236, 72–9.
- Giordano, S. & A. Columbano (2013) MicroRNAs: new tools for diagnosis, prognosis, and therapy in hepatocellular carcinoma? *Hepatology*, 57, 840–7.
- Gramantieri, L., F. Fornari, M. Ferracin, A. Veronese, S. Sabbioni, G. A. Calin, G. L. Grazi, C. M. Croce, L. Bolondi & M. Negrini (2009) MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality. *Clin Cancer Res*, 15, 5073–81.
- Guo, C. J., Q. Pan, D. G. Li, H. Sun & B. W. Liu (2009) miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: An essential role for apoptosis. *J Hepatol*, 50, 766–78.
- Halliwell, B. (2007) Oxidative stress and cancer: have we moved forward?

- Biochem J*, 401, 1–11.
- Hallows, W. C., S. Lee & J. M. Denu (2006) Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10230–5.
- Hampton, R. Y. (2000) ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. *Curr Biol*, 10, R518–21.
- Hirschey, M. D., T. Shimazu, E. Goetzman, E. Jing, B. Schwer, D. B. Lombard, C. A. Grueter, C. Harris, S. Biddinger, O. R. Ilkayeva, R. D. Stevens, Y. Li, A. K. Saha, N. B. Ruderman, J. R. Bain, C. B. Newgard, R. V. Farese, Jr., F. W. Alt, C. R. Kahn & E. Verdin (2010) SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature*, 464, 121–5.
- Hsu, S. H., B. Wang, J. Kota, J. Yu, S. Costinean, H. Kutay, L. Yu, S. Bai, K. La Perle, R. R. Chivukula, H. Mao, M. Wei, K. R. Clark, J. R. Mendell, M. A. Caligiuri, S. T. Jacob, J. T. Mendell & K. Ghoshal (2012) Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest*, 122, 2871–83.
- Humbert, P. O., R. Verona, J. M. Trimarchi, C. Rogers, S. Dandapani & J. A. Lees (2000) E2f3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes Dev*, 14, 690–703.
- Ikeda, H., S. Nishi & M. Sakai (2004) Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis. *Biochem J*, 380, 515–21.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel & M. Yamamoto (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*, 13, 76–86.
- Itoh, K., P. Ye, T. Matsumiya, K. Tanji & T. Ozaki (2015) Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria. *J Clin Biochem Nutr*, 56, 91–7.
- Iyer, N. V., L. E. Kotch, F. Agani, S. W. Leung, E. Laughner, R. H. Wenger, M. Gassmann, J. D. Gearhart, A. M. Lawler, A. Y. Yu & G. L. Semenza (1998)

- Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*, 12, 149-62.
- Jeong, W. S., M. Jun & A. N. Kong (2006) Nrf2: a potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds. *Antioxid Redox Signal*, 8, 99-106.
- Jo, H., S. S. Choe, K. C. Shin, H. Jang, J. H. Lee, J. K. Seong, S. H. Back & J. B. Kim (2013) Endoplasmic reticulum stress induces hepatic steatosis via increased expression of the hepatic very low-density lipoprotein receptor. *Hepatology*, 57, 1366-77.
- Joo, M. S., C. G. Lee, J. H. Koo & S. G. Kim (2013) miR-125b transcriptionally increased by Nrf2 inhibits AhR repressor, which protects kidney from cisplatin-induced injury. *Cell Death Dis*, 4, e899.
- Kang, S. G., W. H. Lee, Y. H. Lee, Y. S. Lee & S. G. Kim (2012) Hypoxia-inducible factor-1alpha inhibition by a pyrrolopyrazine metabolite of oltipraz as a consequence of microRNAs 199a-5p and 20a induction. *Carcinogenesis*, 33, 661-9.
- Ke, Q. & M. Costa (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, 70, 1469-80.
- Kensler, T. W. & N. Wakabayashi (2010) Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis*, 31, 90-9.
- Kensler, T. W., N. Wakabayashi & S. Biswal (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 89-116.
- Kerner, J. & C. Hoppel (2000) Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1486, 1-17.
- Kim, W. D., Y. W. Kim, I. J. Cho, C. H. Lee & S. G. Kim (2012) E-cadherin inhibits nuclear accumulation of Nrf2: implications for chemoresistance of cancer cells. *J Cell Sci*, 125, 1284-95.
- Kim, Y. C., H. Masutani, Y. Yamaguchi, K. Itoh, M. Yamamoto & J. Yodoi (2001) Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding

- factors. *J Biol Chem*, 276, 18399–406.
- Kleizen, B. & I. Braakman (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 343–9.
- Kobayashi, A., M. I. Kang, H. Okawa, M. Ohtsuji, Y. Zenke, T. Chiba, K. Igarashi & M. Yamamoto (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*, 24, 7130–9.
- Kong, X., R. Wang, Y. Xue, X. Liu, H. Zhang, Y. Chen, F. Fang & Y. Chang (2010) Sirtuin 3, a new target of PGC-1 $\alpha$ , plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS One*, 5, e11707.
- Kong, Y., P. S. Bai, H. Sun, K. J. Nan, N. Z. Chen & X. G. Qi (2012) The deoxycholic acid targets miRNA-dependent CAC1 gene expression in multidrug resistance of human colorectal cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 2321–32.
- Koo, J. H., H. J. Lee, W. Kim & S. G. Kim (2016) Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatic Stellate Cells Promotes Liver Fibrosis via PERK-Mediated Degradation of HNRNPA1 and Up-regulation of SMAD2. *Gastroenterology*, 150, 181–193 e8.
- Lee, J. S., Z. Zheng, R. Mendez, S. W. Ha, Y. Xie & K. Zhang (2012) Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in an animal model. *Toxicol Lett*, 211, 29–38.
- Leone, G., J. DeGregori, L. Jakoi, J. G. Cook & J. R. Nevins (1999) Collaborative role of E2F transcriptional activity and G1 cyclindependent kinase activity in the induction of S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6626–31.
- Li, Y., K. Wong, A. Giles, J. Jiang, J. W. Lee, A. C. Adams, A. Kharitonov, Q. Yang, B. Gao, L. Guarente & M. Zang (2014) Hepatic SIRT1 attenuates hepatic steatosis and controls energy balance in mice by inducing fibroblast growth factor 21. *Gastroenterology*, 146, 539–49 e7.
- Liu, L., Y. Wang, R. Bai, K. Yang & Z. Tian (2016) MiR-186 inhibited aerobic glycolysis in gastric cancer via HIF-1 $\alpha$  regulation. *Oncogenesis*, 5, e224.



- Lu, H., R. A. Forbes & A. Verma (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem*, 277, 23111-5.
- Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz & T. R. Golub (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435, 834-8.
- McDaniel, K., L. Herrera, T. Zhou, H. Francis, Y. Han, P. Levine, E. Lin, S. Glaser, G. Alpini & F. Meng (2014) The functional role of microRNAs in alcoholic liver injury. *J Cell Mol Med*, 18, 197-207.
- Meier, P. J., M. A. Spycher & U. A. Meyer (1981) Isolation and characterization of rough endoplasmic reticulum associated with mitochondria from normal rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 646, 283-97.
- Meng, F., R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S. T. Jacob & T. Patel (2007) MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133, 647-58.
- Michan, S. & D. Sinclair (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 404, 1-13.
- Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner & J. Yuan (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403, 98-103.
- Oeggerli, M., S. Tomovska, P. Schraml, D. Calvano-Forte, S. Schafroth, R. Simon, T. Gasser, M. J. Mihatsch & G. Sauter (2004) E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene*, 23, 5616-23.
- Oh, C. J., J. Y. Kim, Y. K. Choi, H. J. Kim, J. Y. Jeong, K. H. Bae, K. G. Park & I. K. Lee (2012) Dimethylfumarate attenuates renal fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor-beta/Smad signaling. *PLoS One*, 7, e45870.
- Orellana-Gavaldà, J. M., L. Herrero, M. I. Malandrino, A. Paneda, M. Sol Rodríguez-Pena, H. Petry, G. Asins, S. Van Deventer, F. G. Hegardt & D.

- Serra (2011) Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology*, 53, 821-32.
- Ozcan, L. (2012) Endoplasmic reticulum stress in cardiometabolic disorders. *Curr Atheroscler Rep*, 14, 469-75.
- Ozcan, L. & I. Tabas (2012) Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med*, 63, 317-28.
- Ozcan, U., Q. Cao, E. Yilmaz, A. H. Lee, N. N. Iwakoshi, E. Ozdelen, G. Tuncman, C. Gorgun, L. H. Glimcher & G. S. Hotamisligil (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306, 457-61.
- Pitts, K. R., Y. Yoon, E. W. Krueger & M. A. McNiven (1999) The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 10, 4403-17.
- Purushotham, A., T. T. Schug, Q. Xu, S. Surapureddi, X. Guo & X. Li (2009) Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab*, 9, 327-38.
- Rachakonda, G., K. R. Sekhar, D. Jowhar, P. C. Samson, J. P. Wikswo, R. D. Beauchamp, P. K. Datta & M. L. Freeman (2010) Increased cell migration and plasticity in Nrf2-deficient cancer cell lines. *Oncogene*, 29, 3703-14.
- Roberts, A. P., A. P. Lewis & C. L. Jopling (2011) miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Res*, 39, 7716-29.
- Roodyn, D. B., P. J. Reis & T. S. Work (1961) Protein synthesis in mitochondria. Requirements for the incorporation of radioactive amino acids into mitochondrial protein. *Biochem J*, 80, 9-21.
- Semenza, G. L. (2007) HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. *J Bioenerg Biomembr*, 39, 231-4.
- Shore, G. C. & J. R. Tata (1977) Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. I. Recovery of rapidly sedimenting endoplasmic reticulum in association with mitochondria. *J Cell Biol*, 72, 714-25.

- Singal, P. K., T. Li, D. Kumar, I. Danelisen & N. Iliskovic (2000) Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem*, 207, 77–86.
- Singh, A., C. Happel, S. K. Manna, G. Acquah-Mensah, J. Carrerero, S. Kumar, P. Nasipuri, K. W. Krausz, N. Wakabayashi, R. Dewi, L. G. Boros, F. J. Gonzalez, E. Gabrielson, K. K. Wong, G. Girnun & S. Biswal (2013) Transcription factor NRF2 regulates miR-1 and miR-206 to drive tumorigenesis. *J Clin Invest*, 123, 2921–34.
- Sone, M., X. Zeng, J. Larese & H. D. Ryoo (2013) A modified UPR stress sensing system reveals a novel tissue distribution of IRE1/XBP1 activity during normal Drosophila development. *Cell Stress Chaperones*, 18, 307–19.
- Sporn, M. B. & K. T. Liby (2012) NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat Rev Cancer*, 12, 564–71.
- Su, H., J. R. Yang, T. Xu, J. Huang, L. Xu, Y. Yuan & S. M. Zhuang (2009) MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res*, 69, 1135–42.
- Suda, T. & D. Liu (2007) Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. *Mol Ther*, 15, 2063–9.
- Suzuki, H. I., K. Yamagata, K. Sugimoto, T. Iwamoto, S. Kato & K. Miyazono (2009) Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, 460, 529–33.
- Szegezdi, E., A. Duffy, M. E. O'Mahoney, S. E. Logue, L. A. Mylotte, T. O'Brien & A. Samali (2006a) ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 349, 1406–11.
- Szegezdi, E., S. E. Logue, A. M. Gorman & A. Samali (2006b) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*, 7, 880–5.
- Teng, L., M. Nakada, S. G. Zhao, Y. Endo, N. Furuyama, E. Nambu, I. V. Pyko, Y. Hayashi & J. I. Hamada (2011) Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. *Br J Cancer*, 104, 798–807.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang & M. A. Nieto (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871–90.

- Trounce, I. A., Y. L. Kim, A. S. Jun & D. C. Wallace (1996) Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. *Methods Enzymol*, 264, 484-509.
- Tung-Ping Poon, R., S. T. Fan & J. Wong (2000) Risk factors, prevention, and management of postoperative recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*, 232, 10-24.
- Wan, S. & L. Jiang (2016) Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants. *Protoplasma*, 253, 753-64.
- Warburg, O. (1956a) On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124, 269-70.
- (1956b) On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309-14.
- Weinberg, F., R. Hamanaka, W. W. Wheaton, S. Weinberg, J. Joseph, M. Lopez, B. Kalyanaraman, G. M. Mutlu, G. R. Budinger & N. S. Chandel (2010) Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 8788-93.
- Weljie, A. M. & F. R. Jirik (2011) Hypoxia-induced metabolic shifts in cancer cells: moving beyond the Warburg effect. *Int J Biochem Cell Biol*, 43, 981-9.
- Wu, Z., P. Puigserver, U. Andersson, C. Zhang, G. Adelmant, V. Mootha, A. Troy, S. Cinti, B. Lowell, R. C. Scarpulla & B. M. Spiegelman (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98, 115-24.
- Xu, N., J. Zhang, C. Shen, Y. Luo, L. Xia, F. Xue & Q. Xia (2012) Cisplatin-induced downregulation of miR-199a-5p increases drug resistance by activating autophagy in HCC cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 423, 826-31.
- Xu, T., Y. Zhu, Y. Xiong, Y. Y. Ge, J. P. Yun & S. M. Zhuang (2009) MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G1/S transition of human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*, 50, 113-21.
- Yang, J. & R. A. Weinberg (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 14, 818-29.
- Yang, Y. M., C. G. Lee, J. H. Koo, T. H. Kim, J. M. Lee, J. An, K. M. Kim & S. G.

- Kim (2015a) Galpha12 overexpressed in hepatocellular carcinoma reduces microRNA-122 expression via HNF4alpha inactivation, which causes c-Met induction. *Oncotarget*, 6, 19055-69.
- Yang, Y. M., W. H. Lee, C. G. Lee, J. An, E. S. Kim, S. H. Kim, S. K. Lee, C. H. Lee, D. N. Dhanasekaran, A. Moon, S. Hwang, S. J. Lee, J. W. Park, K. M. Kim & S. G. Kim (2015b) Galpha12 gep oncogene deregulation of p53-responsive microRNAs promotes epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 34, 2910-21.
- Zawacka-Pankau, J., N. Issaeva, S. Hossain, A. Pramanik, G. Selivanova & A. J. Podhajski (2007) Protoporphyrin IX interacts with wild-type p53 protein in vitro and induces cell death of human colon cancer cells in a p53-dependent and -independent manner. *J Biol Chem*, 282, 2466-72.
- Zhang, Q., X. Tang, Q. Lu, Z. Zhang, J. Rao & A. D. Le (2006) Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit hypoxia- and serum-induced HIF-1alpha protein accumulation and VEGF expression in human cervical carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther*, 5, 1227-38.
- Zhao, A., Q. Zeng, X. Xie, J. Zhou, W. Yue, Y. Li & X. Pei (2012) MicroRNA-125b induces cancer cell apoptosis through suppression of Bcl-2 expression. *J Genet Genomics*, 39, 29-35.
- Zhou, J., D. Xu, H. Xie, J. Tang, R. Liu, J. Li, S. Wang, X. Chen, J. Su, X. Zhou, K. Xia, Q. He, J. Chen, W. Xiong, P. Cao & K. Cao (2015) miR-33a functions as a tumor suppressor in melanoma by targeting HIF-1alpha. *Cancer Biol Ther*, 16, 846-55.

## **VI. Abstract**

### **Role of Nrf2-mediated energy metabolism in the inhibition of liver injury and PPIX-inhibition of cancer progression**

Jung Min Lee

Advisor: Prof. Sang Geon Kim

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most prevalent cancers and is classified as a poor prognostic tumor, but promising therapy for HCC metastasis is currently very limited. Epithelial-Mesenchymal transition (EMT) phenotype represents chemoresistance, metastasis, and poor prognosis in HCC. Mesenchymal cells adapt to tumor microenvironment to induce cell proliferation and metastasis. Endoplasmic reticulum (ER) stress caused by multiple physiological or pathological conditions initiates a compensatory response, which increases the capacity for protein folding for cell survival, but accumulation of misfolded protein and unfolded protein response result in apoptosis. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is expressed widely in a variety of tissues and functions as a buffer defending against the accumulation of reactive oxygen species (ROS) during the unfolded protein response.

This study investigated whether a candidate of Nrf2 activator, protoporphyrin (PPIX) inhibits HCC progression and Nrf2 protects ER stress induced liver injury. In view of the

effect of PPIX on HCC, PPIX enables mesenchymal HCC to restore dysregulated miRNAs. In addition, new targets of the miRNA(s) that contribute to the anti-cancer effects were explored. Of the ten miRNAs predicted by the 3'-UTR of HIF-1 $\alpha$  mRNA, PPIX treatment induced miR-199a-5p, leading to the inhibition of E2F3 expression which is upregulated in mesenchymal HCC. miR-199a-5p levels were downregulated in HCC with E2F3 overexpression. An approach modulating epithelial-mesenchymal transition provided the expected changes in miR-199a-5p and E2F3 in vivo. PPIX prevented tumor cell growth and migration/invasion, and had a synergistic anti-cancer effect when combined with chemotherapeutics. In a xenograft model, PPIX treatment decreased overall growth and average tumor volume, which paralleled E2F3 inhibition.

Nrf2 promoted the expression of CPT1 and PGC-1 $\alpha$ , and enhanced oxygen consumption and ATP generation. ER stress down-regulated Sirt3 and diminished the ability of Nrf2 to increase CPT1 and PGC-1 $\alpha$  levels. Nrf2 served as a transcription factor to induce Sirt3, and increased NAD<sup>+</sup>/NADH ratio. In the liver samples of patients with NASH or mice fed a HFD, Nrf2 and Sirt3 were both downregulated. Treatment of mice with ER stress inducers triggered hepatocyte injury, which was preceded by repression of Nrf2. A deficiency of Nrf2 enhanced ER stress, whereas its activation had the opposing effect. In addition, hydrodynamic gene delivery of Sirt3 inhibited ER stress and protected from liver injury.

Overall, this study suggested Nrf2 as a regulator of liver injury and HCC through

modulating energy metabolism. In HCC developed by chronic liver injury, PPIX induced miR-199a-5p to inhibit HIF-1 $\alpha$  and E2F3 responsible for induction of genes crucial for energy metabolism and cell cycle, respectively. ER stress triggered liver injury, which is preceded by repression of Nrf2 responsible for Sirt3 induction and Sirt3-mediated energy metabolism in the mitochondria.

**Keywords:** Nrf2, hepatocellular carcinoma, protoporphyrin, microRNA, ER stress, mitochondria, liver injury

**Student ID number:** 2011-31105